



Universidad Autónoma de Madrid

# Caracterización fenotípica y molecular de las células madre obtenidas del saco amniótico de la placenta humana. Estudio de su plasticidad.

Trabajo de tesis doctoral de M<sup>a</sup> Isabel Macías Borrego

Trabajo dirigido por:  
Dra. Flores de la Cal

Trabajo tutelado por:  
Dr. Sanz Rodríguez

Trabajo realizado en la Unidad de Investigación del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid.

Imagen de la Portada: Leonardo da Vinci, El Códice Windsor.



A mis padres y hermano





¿Fue primero una molécula pequeña  
flotando sobre el mar originario?  
¿Fue ella? ¿Consiguió capturar con arduo esfuerzo  
materiales para duplicarse y no estar sola?  
¿Fue ella?  
¿Inerte, casi inorgánica, pudo  
dar ese paso inmenso en el inicio del tiempo?  
No tenía nombre, ni entidad, ni valor y sin embargo  
contenía la totalidad del pensamiento.  
La pálida silueta de la angustia,  
la pésima alegría, el verde y la Odisea.  
Albergaba, sin saberlo, multitudes.  
¿Fue ella?

Leonardo Moledo (en Historia de las células,  
Editorial: capital intelectual)



Cuando decides hacer una tesis doctoral sabes que te enfrentas a un camino difícil en el que cada fracaso experimental es el mayor de los desastres, pero un mínimo éxito anima y te hace seguir adelante. Pero aunque no queramos, este camino nunca lo recorreremos solos, sino que muchas personas nos acompañan, tanto en el ámbito científico como en el personal. Estas personas ponen su granito de arena, aunque no lo sepan, en la elaboración de la tesis y sus desventuras, con su apoyo y consejo.

En primer lugar quiero dar las gracias a mis padres, que siendo “más pobres que las ratas” trabajaron y lucharon para hacerme hoy ser tal y como soy, con mis virtudes y mis defectos y es sólo gracias a su esfuerzo que yo haya llegado hasta aquí. En segundo lugar a mi hermano, que siempre ha creído en mí y me ha apoyado en los momentos bajos, ayudándome siempre a volver al camino adecuado. A mi “cuñao” Lolo gracias por llegar sin avisar y quedarte sin permiso.

Por otro lado, quiero también agradecer a mi directora la Dra. Flores la oportunidad que me ha dado para realizar este trabajo tan maravilloso con el que he aprendido tanto. Al Dr. Bornstein, gracias por conseguir la primera placenta y hacer todo esto posible y a Jesús Grande, gracias por convertirnos en “sus placentitas”. Quiero agradecer también a la Dra. Vegh su comprensión y colaboración constantes y al Dr. Sanz su ayuda y apoyo.

Un lugar muy importante en esta historia ocupan los compañeros de trabajo que con el tiempo pasado juntos se convierten en buenos amigos:

Ana Rivero, una gran amiga, desde el día en que nos encontramos en el pasillo, ya no me sentí sola en el hospital. Contigo he compartido malos y buenos momentos, dudas y consejos, por todo ello gracias.

Inma, me alegro de haberte encontrado como amiga. Gracias por tus consejos y por apaciguarme cuando me cabreo, gracias por aguantarme con paciencia y hacerme ver las cosas de otra manera con tu serenidad.

Fer, gracias por esas carcajadas continuas y tu buen humor, gracias por escucharme cuando me pongo pesada, gracias por quitarme el postre y hacerme reír, mil gracias.

Irene Domínguez, gracias por no rendirte, por creer en mí, por ayudarme a tirar del carro cuando se hizo pesado, y además, por como nos reímos cuando estamos juntas.

Gracias a Julia, Marbella y Montse por los desayunos juntas que han conseguido más de una vez alegrarme el día y a Elena Tapia gracias por decirme esas cosas tan bonitas cuando más lo necesitaba.

A mi Raquelita gracias por los últimos meses y por aguantarme con paciencia. Gracias por los buenos y los malos ratos compartidos. Sin ti el tramo final no habría sido tan divertido.

Inés, Rebe-rebe, Cris, Laura España, Anita, Nere, Nuria, María y Vanessa (mi club del humo) y Noe (mi anti-humo más ferviente) gracias chicas por compartir dudas, consejos y protocolos en esos cigarritos rápidos. Gracias por echarme de menos y hacer que os eche de menos.

Y a Paloma y a Carmen, gracias por acogerme cuando estaba sola y gracias por tantas risas compartiendo ratos de patio.

Todos sois únicos y valiosos en mi mundo desordenado.

No puedo olvidarme de María Fernández Lobato, tú me diste mi primera oportunidad científica y de tu mano aprendí a dar mis primeros pasos en la ciencia, no sabes cuanto te lo agradezco.

Lola, Bea, Mariajo, Miguelillo, Silvia, Alicia y Laura, que bien lo he pasado con vosotros en esos laboratorios minúsculos del CBM antiguo.

Por último, y no menos importante, quiero dar también las gracias a todas aquellas personas que no han creído en mí, que no me han ayudado o no me han valorado, porque también gracias a ellos he aprendido a superarme a mi misma para conseguir mis metas.

M<sup>a</sup> Isabel Macías Borrego.





I.- Resumen .....	Página 21
II.- Introducción	
1.- Células Madre: clasificación y propiedades .....	Página 25
2.- Células Madre Mesenquimales .....	Página 27
2.1.- Introducción .....	Página 27
2.2.- Comportamiento en cultivo de las Células Madre Mesenquimales .....	Página 29
2.3.- Plasticidad de las Células Madre Mesenquimales ...	Página 30
2.4.- Características inmunogénicas de las Células Madre Mesenquimales .....	Página 32
3.- La placenta humana: estructura y función .....	Página 34
3.1.- Células Madre obtenidas de la placenta humana .....	Página 40
3.1.1.- Células madre derivadas de la placa o villi coriónico .....	Página 41
3.1.2.- Células madre obtenidas del cordón umbilical .....	Página 41
3.1.3.- Células madre obtenidas del líquido amniótico .....	Página 42
3.1.4.- Células Madre derivadas de la membrana amniótica .....	Página 43
3.1.5.- Células Madre derivadas de la membrana coriónica .....	Página 44
3.1.6.- Células Madre derivadas de la decidua materna .....	Página 45
III.- Objetivos e hipótesis de trabajo .....	Página 51
IV.- Material y Métodos	
1.- Obtención de las muestras .....	Página 55
2.- Extracción de células del saco amniótico .....	Página 55
3.- Mantenimiento de los cultivos .....	Página 56
4.- Estudio de la procedencia materno-fetal .....	Página 56
4.1.- Hibridación <i>in situ</i> fluorescente .....	Página 56

4.2.- Estudio de repeticiones cortas en tándem .....	Página 57
5.- Dinámica de la población .....	Página 57
6.- Citometría de flujo .....	Página 58
7.- Estudio de plasticidad .....	Página 58
7.1.- Diferenciación hacia el linaje mesodérmico .....	Página 58
7.1.1.- Diferenciación adipogénica .....	Página 58
7.1.2.- Diferenciación Osteogénica .....	Página 59
7.1.3.- Diferenciación Condrogénica .....	Página 59
7.1.4.- Diferenciación Miogénica .....	Página 59
7.1.5.- Diferenciación Cardíaca .....	Página 60
7.2.- Diferenciación hacia el linaje endodérmico .....	Página 60
7.2.1.- Diferenciación Hepato-Pancreática .....	Página 60
7.2.2.- Diferenciación Pulmonar .....	Página 60
7.3.- Diferenciación hacia el linaje ectodérmico .....	Página 61
7.3.1.- Diferenciación Neural .....	Página 61
8.- Tinciones .....	Página 61
8.1.- Tinción con Oil Red O .....	Página 61
8.2.- Tinción con Alizarín Red S .....	Página 61
8.3.- Tinción de Fosfatasa alcalina .....	Página 62
8.4.- Inmunofluorescencia .....	Página 62
8.5.- Tinción con Ácido Periódico Schiff .....	Página 63
9.- Cultivos de fibroblastos .....	Página 64
10.- Transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa .....	Página 64
10.1.- Purificación de ácido ribonucleico (ARN) .....	Página 64
10.1.1.- Purificación de ARN con <i>AquaPure</i> .....	Página 65
10.1.2.- Purificación de ARN con <i>MasterPure<sup>TM</sup></i> ..	Página 65
10.2.- Síntesis de ADN codificante (ADNc) .....	Página 66



10.3.- Análisis de la expresión génica mediante la reacción en cadena de la polimerasa .....	Página 67
10.4.- Densitometría de bandas .....	Página 67
11.- Análisis del Cariotipo .....	Página 69
12.- Determinación de la actividad telomerasa .....	Página 69
13.- Criopreservación .....	Página 71
14.-Cocultivos .....	Página 71
15.- Nucleofección .....	Página 73
 V.- Resultados	
1.- Obtención de células del saco amniótico de la placenta humana .....	Página 77
2.- Estudio de la procedencia de las células obtenidas del saco amniótico de la placenta humana .....	Página 79
3.- Estudio de la dinámica de la población de las células obtenidas del saco amniótico .....	Página 82
4.- Caracterización fenotípica y molecular de las células obtenidas de la decidua .....	Página 83
4.1.- Estudio del fenotipo mesenquimal .....	Página 83
4.2.- Estudio de las características inmunológicas de las células derivadas de la decidua .....	Página 87
4.3.- Estudio de la expresión de marcadores de células embrionarias .....	Página 90
5.- Estudio de la capacidad de diferenciación <i>in vitro</i> de las células derivadas del saco amniótico de la placenta humana ..	Página 93
5.1.- Diferenciación hacia el linaje mesodérmico .....	Página 93
5.1.1.- Diferenciación Adipogénica .....	Página 93
5.1.2.- Diferenciación Osteogénica .....	Página 96
5.1.3.- Diferenciación Condrogénica .....	Página 99
5.1.4.- Diferenciación Miogénica .....	Página 101
5.1.5.- Diferenciación Cardíaca .....	Página 104
5.2.- Diferenciación hacia el linaje endodérmico .....	Página 106

5.2.1.- Diferenciación Hepato-Pancreática .....	Página 106
5.2.2.- Diferenciación Pulmonar .....	Página 112
5.3.- Diferenciación hacia el linaje ectodérmico .....	Página 115
5.3.1.- Diferenciación Neural .....	Página 115
6.- Determinación de la estabilidad genómica. Análisis del cariotipo .....	Página 118
7.- Determinación de la actividad telomerasa .....	Página 119
8.- Determinación de la cinética de crecimiento tras el almacenaje mediante criopreservación .....	Página 121
9.- Determinación de la capacidad de transfección mediante la técnica de nucleofección .....	Página 123
VI.- Discusión .....	Página 129
VII.- Corolario y conclusión final .....	Página 153
VIII.- Bibliografía .....	Página 157

## A

---

ADN → Ácido desoxirribonucleico.

ADNc → ADN codificante.

AMPc → N6,2'-O-Dibutiriladenosina 3',5'- monofosfato cíclico sal sódica monohidrato

ANP → Péptido atrial natriurético

AP4 → Proteína de unión a ácidos grasos 4

ARN → Ácido ribonucleico.

ARNasa → Ribonucleasa

## B

---

BHA → Hidroxianisol butilado

## C

---

CMH → Complejo mayor de histocompatibilidad

## D

---

DAPI → 4',6'-diamidino-2-fenilindol

DMEM → Medio Esencial Dulbecco Modificado

DMSO → Dimetil sulfóxido

dNTP → desoxi-nucleótido trifosfato

## E

---

EDTA → Ácido Etilendiaminotetraacético

## F

---

FGF-4 → Factor de crecimiento de fibroblastos-4

FGF-básico → Factor de crecimiento de fibroblastos-básico

FISH → Hibridación *in situ* fluorescente

FITC → Fluoresceína-5-isotiocianato

## G

---

GAPDH → Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa

GFP → Proteína verde fluorescente

## H

---

h-EGF → Factor de crecimiento epitelial humano

HGF → Factor de crecimiento de hepatocitos

HLA → Antígeno del sistema mayor de histocompatibilidad

## I

---

IBMX → 3-Isobutil-1-metilxantina

Ig → Inmunoglobulina

## M

---

MSC → Célula madre mesenquimal

## N

---

NF200 → Neurofilamento 200

## P

---

pb → pares de bases

PBS → Tampón fosfato salino

PCR → Reacción en cadena de la polimerasa

PE → Ficoeritrina

PerCP → Complejo proteico Peridina-Clorofila

PPAR $\gamma$ 2 → Receptor gamma 2 de peroxisomas proliferativos activados

## Q

---

QF-PCR → Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa fluorescente

## R

---

rpm → revoluciones por minuto

RT → Transcriptasa inversa (reversa)

## S

---

SCF → Factor de células madre

SSC → Citrato Sódico Salino

## T

---

TGF $\beta$ 1 → Factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1

TRITC → Tetrametilrodamina isotiocianato





## I.- RESUMEN.





Las células mesenquimales humanas son células multipotentes capaces de diferenciarse a una amplia variedad de linajes celulares. Las células mesenquimales indiferenciadas muestran una morfología tipo fibroblasto. Hasta el momento, la médula ósea es la principal fuente de obtención de estas células madre que han sido objeto de un gran número de estudios clínicos y experimentales. Más recientemente, muchos estudios, han comprobado que la placenta humana, además de células madre hematopoyéticas, posee una población de células troncales que se asemeja a las células mesenquimales. En este trabajo, se presenta a la placenta humana como un recurso alternativo de células madre. Asimismo, se realiza una exhaustiva caracterización fenotípica y molecular, así como un completo estudio de plasticidad de las células obtenidas.

Desde el punto de vista de su origen, el análisis de las células obtenidas de tres placentas diferentes de niños nacidos varón, muestra que las células presentan un cariotipo femenino 46 XX, indicando la procedencia materna de las mismas.

Por otro lado, las células obtenidas presentan la morfología típica de células mesenquimales y además expresan los antígenos de membrana típicos, pues son positivas para CD44, CD90, CD117, CD73, CD29, CD13, CD105 y CMH clase I. Estas células, sin embargo, son negativas para los antígenos de membrana característicos de las células madre hematopoyéticas que son CD34, CD45, CD133, BCRP1, los marcadores inmunogénicos CMH de clase II, CD40, CD80, CD86 y los marcadores de células embrionarias SSEAs y TRAs.

Estas células, también muestran una amplia plasticidad, pues son capaces de diferenciarse *in vitro* hacia linajes de las tres capas germinales como son adiposo, óseo, cartilaginoso, muscular, cardíaco, pulmonar, hepato-pancreático y neural. Además, las células de la decidua mantienen un cariotipo estable durante todo el proceso de cultivo, no presentan elevados niveles de actividad telomerasa, no sufren modificación en su comportamiento en cultivo con la criopreservación en nitrógeno líquido y son susceptibles de ser transfectadas con alta eficiencia.

Podemos concluir por tanto, que la decidua materna de la placenta humana contiene una importante población de células madre de tipo mesenquimal con una amplia capacidad multipotencial que puede abrir nuevos campos en estudios de ingeniería de tejidos y trasplante celular.



## II.- INTRODUCCIÓN.



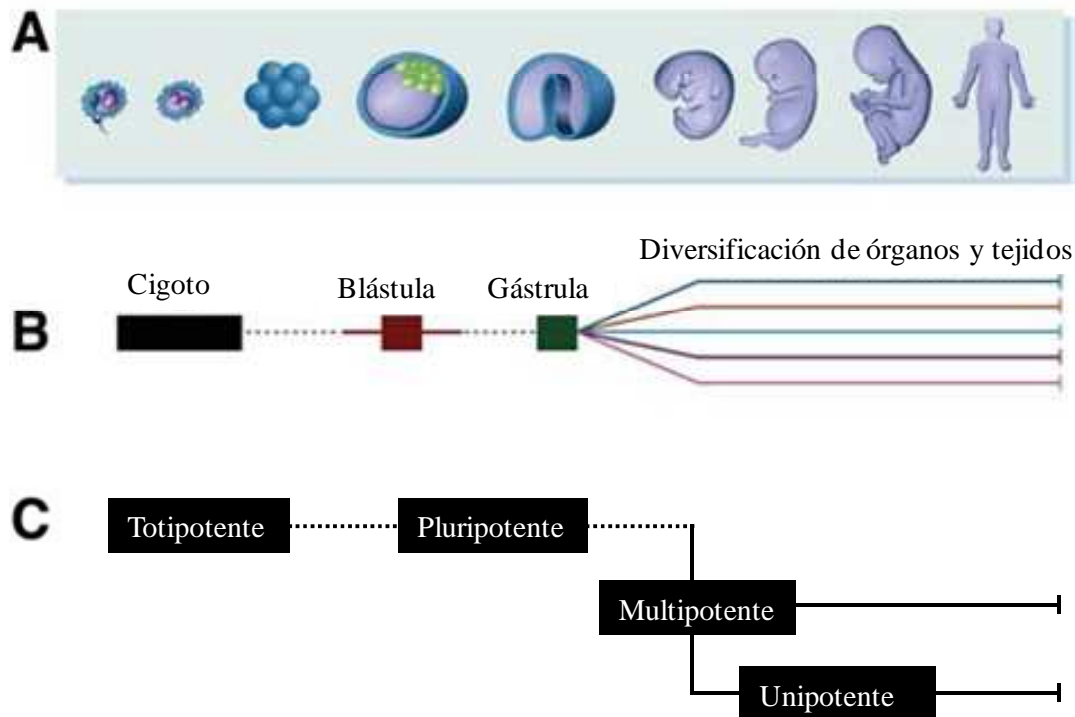
## **1.- Células madre: Clasificación y propiedades.**

Una célula madre es una célula poco especializada que es capaz de dividirse, simétrica o asimétricamente, manteniendo una población estable, y que además, bajo los estímulos adecuados, es capaz de diferenciarse a células especializadas de diferentes tejidos. Esta capacidad de diferenciación se conoce como plasticidad o potencialidad de las células madre y puede alcanzar diferentes niveles. Las células madre se clasifican en función de la capacidad de diferenciación que presentan. Desde este punto de vista, se puede englobar a las células madre en cuatro categorías (Figura 1):

- **Totipotente**: Una célula es totipotente cuando es capaz de dar lugar a todos los tipos celulares que se encuentran en un embrión, feto u organismo desarrollado, y además a los componentes extraembrionarios necesarios para el desarrollo del embrión durante el embarazo. Se considera que son totipotentes el cigoto y sus células en estadios muy tempranos tras la fertilización (Pedrosa, 2006).
- **Pluripotente**: Una célula madre es pluripotente si puede convertirse en todos los tipos celulares de un embrión implantado, feto u organismo desarrollado, pero no pueden originar los componentes extraembrionarios necesarios para el desarrollo del embarazo (Pedrosa, 2006).
- **Multipotente**: Las células madre multipotentes residen en tejidos y órganos adultos y bajo determinadas condiciones son capaces de diferenciarse a otros tipos de células especializadas del tejido en el que residen o de tejidos provenientes de la misma capa embrionaria (Zurriarán, 2009).
- **Unipotente**: Las células madre capaces de autorrenovarse y dar origen a un solo tipo de célula especializadas se conocen como unipotentes (Pedrosa, 2006).

La potencialidad de una célula madre va a depender del estadio del desarrollo en que se aísle, y por tanto depende de su origen. En función de su origen las células madre se clasifican en dos grandes grupos: células madre embrionarias y células madre adultas. Se considera **células madre embrionarias** a aquellas células provenientes tanto de tejidos fetales, como de la masa interna del embrión. Se considera **células madre**

**adultas** a todas las células aisladas de tejidos, órganos o sistemas completamente diferenciados (Nombela, 2007).



**Figura 1.- Clasificación de las células madre.** (A y B) Representación esquemática de las fases del desarrollo humano desde la fecundación hasta la vida adulta. (C) Aparición y persistencia de los diferentes tipos de células madre a lo largo de la vida del individuo. (Modificado de Zipori, 2005).

En un principio se pensó que las células madre adultas eran uni o multipotentes, es decir, que sólo podían dar lugar a células diferenciadas de su tejido de origen. Sin embargo, a finales de los años 90 muchos estudios descubrieron que su capacidad de diferenciación era más amplia de la inicialmente propuesta. Por esta causa se hizo necesario el establecimiento del término **plasticidad** para designar la capacidad que posee una célula madre adulta para generar células de diferentes linajes al de su tejido, órgano o sistema de origen (National Institutes of Health, 2001). Se ha demostrado la presencia de células madre adultas en tejidos de diferente naturaleza, como son la médula ósea, sistema nervioso, epidermis, músculo, hígado, páncreas, pulmón, tejido adiposo o cordón umbilical, aunque se encuentran en muy pocas cantidades (Soler-Botija y col., 2008). En estos tejidos, las células madre adultas realizan tareas imprescindibles de autorrenovación y mantenimiento de la homeostasis tisular (Li y

Xie, 2005). Los lugares donde las células madre adultas residen se han denominado **nichos**. El concepto de nicho describe no sólo el lugar donde las células madre residen, sino también el “microambiente” que las rodea y que se encarga de controlar su destino y su capacidad de autorrenovación y diferenciación, tanto en condiciones fisiológicas normales como patológicas, es decir, en caso de lesión o enfermedad (Naveiras y Daley, 2006 y Snykers y col., 2009). La fuente más habitual de obtención de células madre adultas es la médula ósea ya que resulta relativamente más accesible que otros tejidos. Hasta la fecha, las células madre más estudiadas de la médula ósea son las células madre hematopoyéticas. Sin embargo, la médula ósea posee otra población de células progenitoras, denominadas **células madre mesenquimales o células madre estromales**, que han despertado mucho interés en biomedicina en los últimos años.

## **2.- Células madre Mesenquimales.**

### **2.1.- Introducción:**

El patólogo alemán Cohnheim sugirió hace 130 años la presencia de células madre no hematopoyéticas en la médula ósea (Prockop, 1997). Sin embargo, hasta 1976 no se demostró de forma inequívoca su existencia (Friedenstein y col., 1976). Este trabajo demostró la existencia de una población celular que tenía la capacidad de adherirse al plástico tras varias horas de cultivo. Se trataba de una población heterogénea en la que abundaban unas células alargadas capaces de formar colonias y de multiplicarse rápidamente. Después de varios pases, la población celular se volvía más homogénea desde el punto de vista morfológico y se componía únicamente por unas células de tipo fibroblasto. Durante los años 80, otros grupos de investigación fueron capaces de aislar esta población celular y sus estudios demostraron que estas células eran multipotenciales y tenían la capacidad de diferenciarse a osteoblastos, condrocitos, adipocitos y mioblastos (Ashton y col., 1980; Castro-Malaspina y col., 1980 y Bab y col., 1986). Dada su capacidad de diferenciación hacia células de tipo mesenquimal, a estas células no hematopoyéticas se les llama células madre mesenquimales. También se las describe como células madre estromales ya que se encargan de las complejas estructuras de soporte que se encuentran en la médula ósea (Prockop, 1997).

Se han aislado células madre multipotentes con características de células madre mesenquimales de tejidos tan diversos como el tejido adiposo, la membrana sinovial, el

músculo esquelético, la dermis, pericitos, el hueso trabecular, el pulmón, la pulpa dental, el hígado fetal (Chen y col., 2008), la gelatina de Wharton del cordón umbilical (Sarugaser y col., 2005), el líquido amniótico (Kim y col., 2007), la placenta (Parolini y col., 2008) e incluso la sangre menstrual (Meng y col., 2007). Esto sugiere que las células madre mesenquimales presentan una amplia distribución en los organismos y residen virtualmente en todos los tejidos y órganos postnatales (Chamberlain y col., 2007).

Las células madre mesenquimales han despertado un gran interés biológico y clínico que ha ido en aumento desde su descubrimiento. Actualmente existen muchos grupos de investigación en el mundo estudiando su biología y sus posibles aplicaciones clínicas. Las células madre mesenquimales carecen de marcadores específicos que permitan su aislamiento de una forma rápida y fácil (Minguell y col., 2001 y Miao y col., 2006). Así, se describe que una célula madre es de tipo mesenquimal cuando expresa en su superficie una serie de moléculas entre las que se incluyen CD105 (SH2), CD73 (SH3/4), CD44, CD90 (Thy-1), CD71, y Stro-1 y las moléculas de adhesión CD106, CD166 y CD29. Por otro lado, estas células son negativas para los marcadores característicos de las células hematopoyéticas como son CD34, CD45, CD133 (Chamberlain y col., 2007) y BCRP1 un marcador característico de la subpoblación denominada SP (siglas del inglés *side population*; Zhou y col., 2001). Por lo tanto, las células madre mesenquimales se aíslan aprovechando su capacidad de adherencia al plástico de la placa de cultivo y se caracterizan en base a la expresión conjunta de los marcadores de superficie antes descritos.

El Comité de Células Madre y Tejidos Mesenquimales perteneciente a la Sociedad Internacional de Terapia Celular, ha establecido la tres normas mínimas que una población celular debe cumplir para ser considerada como células madre mesenquimales (Dominici y col., 2006):

- Las células deben presentar la capacidad de adherencia al plástico en las condiciones estándar de cultivo
- Las células madre mesenquimales deben ser positivas para los marcadores de superficie CD105, CD73 y CD90 y negativas para los marcadores



hematopoyéticos CD34, CD45 y para los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (CMH-DR).

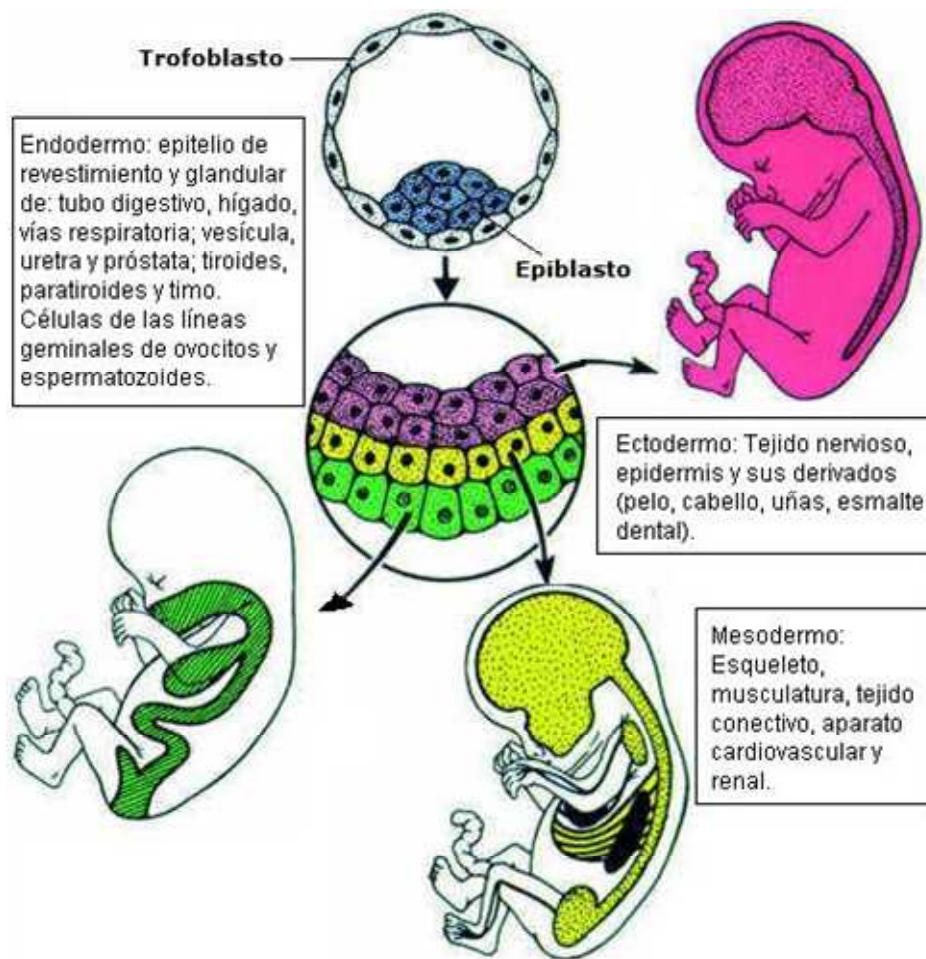
- Las células madre mesenquimales tienen que tener la capacidad de diferenciarse *in vitro* hacia el linaje adipogénico, osteogénico y condrogénico.

## **2.2.- Comportamiento en cultivo de las células madre mesenquimales.**

Las células madre mesenquimales presentan la capacidad de expandirse en cultivo de forma continuada, manteniendo sus características fenotípicas y de plasticidad. Después de su aislamiento presentan una pequeña fase de latencia y posteriormente las células crecen formando colonias con una dinámica exponencial y cuyo tiempo de generación depende de la densidad inicial del cultivo (Chamberlain y col., 2007). Esta característica es muy importante ya que a pesar de obtenerse un número bajo de células madre mesenquimales de un tejido adulto, en poco tiempo se puede disponer de una población suficientemente amplia que permita la realización de estudios muy diversos. Sin embargo, la capacidad de proliferación de las células madre mesenquimales *in vitro* es limitada y con el tiempo se produce una disminución en la tasa de proliferación celular. Este fenómeno conocido como senescencia se debe principalmente al acortamiento progresivo de los telómeros durante las divisiones celulares. Este fenómeno ocurre normalmente en todas las poblaciones de células diploides somáticas y también lo experimentan muchas poblaciones de células madre adultas. En estas poblaciones celulares el número de divisiones final depende de la longitud de los telómeros de la población celular de partida (Guillot y col., 2007) y esto es debido a que no presentan actividad de la enzima telomerasa (Abdallah y Kassem, 2008). La telomerasa es una enzima ribonucleasa que añade repeticiones teloméricas al final de los cromosomas, conservando así la longitud de los telómeros y desempeñando un papel muy importante en el mantenimiento de la capacidad replicativa de una célula (Thomson y col., 1998). La capacidad de división indefinida que presentan algunos tipos de células madre resulta muy atractiva desde el punto de vista de su uso *in vitro*. Sin embargo, *in vivo* esta capacidad de proliferación indefinida puede dar lugar a la formación de tumores ya que se trata de una de las características más típicas de las células cancerígenas (Czyz y col., 2003). Las células madre mesenquimales presentan un número finito de divisiones celulares debido a su capacidad de proliferación limitada en cultivo. Esto las hace muy atractivas desde el punto de vista de la terapia celular y medicina regenerativa.

### 2.3.- Plasticidad de las células madre mesenquimales.

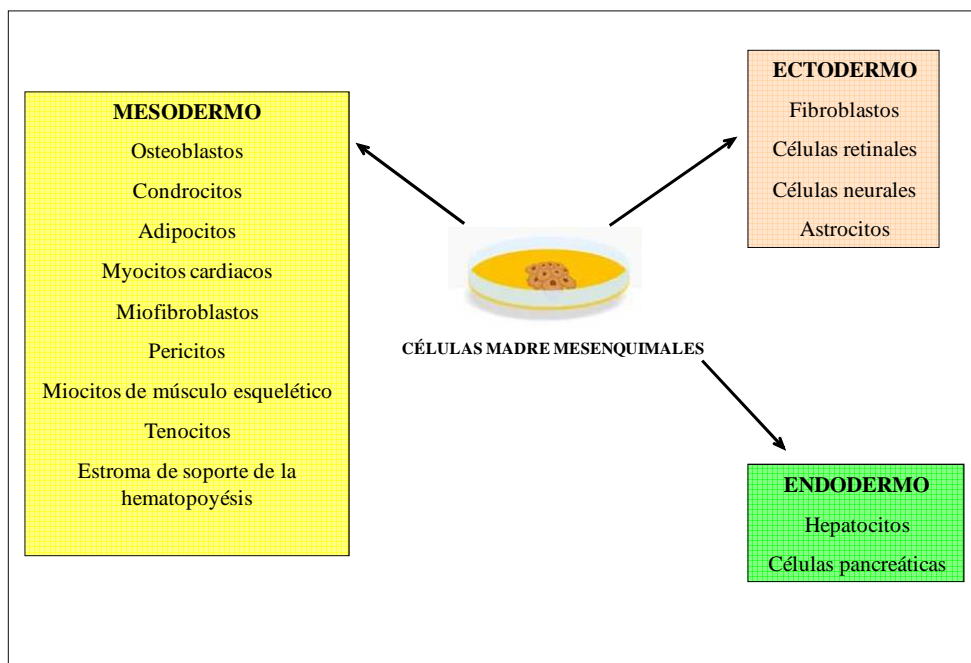
El término plasticidad se define como la capacidad que presenta una célula madre adulta de diferenciarse hacia células especializadas pertenecientes a un tejido, órgano o sistema distinto al de su origen. El linaje al que pertenece un órgano o tejido viene determinado por la ontogenia del mismo, es decir, por la capa embrionaria de la que se genera durante el desarrollo embrionario. En la figura 2 se representan de forma esquemática las tres láminas embrionarias y los tejidos que de ellas se derivan.



**Figura 2.- Representación esquemática de los órganos y tejidos derivados de las tres capas germinales.** Modificado de Células madre: entre la esperanza y la controversia Por: Ferney Yesyd Rodríguez [www.sindioses.org/sociedad/stemcell.html](http://www.sindioses.org/sociedad/stemcell.html).

En un principio se pensaba que las células madre mesenquimales sólo eran capaces de diferenciarse a células provenientes del mesodermo. Sin embargo, se ha demostrado que las células madre mesenquimales tienen una gran plasticidad al ser capaces de diferenciarse a tejidos derivados de las tres láminas embrionarias, bajo condiciones

experimentales específicas *in vitro* (Pountos y Giannoudis, 2005). En la figura 3 se representan de forma esquemática todos los tipos celulares que se han obtenido de la diferenciación de las células madre mesenquimales. Esta elevada capacidad de diferenciación convierte a las células madre mesenquimales en unas candidatas idóneas para estudios de regeneración tisular *in vivo*, donde han demostrado que después del trasplante son capaces de injertarse en tejidos como el hueso, el músculo, el cerebro, el pulmón, el corazón, el hígado, el tracto gastrointestinal y el sistema hematopoyético (Chen y col., 2008). Sin embargo, el mecanismo específico responsable de la diferenciación de las células madre mesenquimales no se conoce. Como causantes de este fenómeno se han propuesto mecanismos de transdiferenciación, desdiferenciación, fusión con células residentes en los tejidos y a veces combinaciones de estos mecanismos (Chen y col., 2008).



**Figura 3.- Tipos celulares obtenidos a partir de la diferenciación de las células madre mesenquimales.**

Dada la elevada plasticidad de las células madre mesenquimales y su amplia distribución, se ha postulado que las células madre mesenquimales actúan en el cuerpo humano como reservorios de células regenerativas sin características específicas de ningún tejido. Así, una vez que se produce una lesión en el cuerpo humano, se producirían señales que movilizarían a las células madre mesenquimales hacia el lugar

donde hay daño celular y una vez allí las células madre mesenquimales se diferenciarían hacia el linaje necesario. Por lo tanto, la quimiotaxis y el microambiente tisular juegan un papel importante en el destino de las células madre mesenquimales (Pountos y Giannoudis, 2005).

#### **2.4.- Características inmunogénicas de las células madre mesenquimales.**

Uno de los mayores problemas que presentan los trasplantes tanto de células madre como de órganos sólidos es el rechazo del injerto por parte del receptor. De hecho, muchos pacientes mueren debido a enfermedades no relacionadas directamente con el trasplante o el órgano trasplantado, sino a causa del ataque de su propio sistema inmune que rechaza el injerto. Las proteínas responsables de que un tejido o célula injertada sea percibido como similar o diferente a los tejidos propios forman parte de un locus altamente polimórfico que se conoce como complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). La función fisiológica de este complejo mayor de histocompatibilidad es la presentación de antígenos a los linfocitos T, que son los encargados de la activación de los linfocitos B, los macrófagos y las células dendríticas, desencadenando la respuesta inmune. Existen dos tipos principales de moléculas del CMH denominadas CMH de clase I y CMH de clase II. Las moléculas de clase I presentan péptidos a los linfocitos T citotóxicos  $CD8^{+}$  y las de clase II a los linfocitos T cooperadores  $CD4^{+}$ . Para que las células que expresan moléculas de histocompatibilidad en su superficie puedan activar a los linfocitos T y B directamente, deben presentar en su superficie las moléculas coestimuladoras CD40, CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2) que son encargadas de producir una señal secundaria de activación en los linfocitos. Además, existe una vía secundaria o indirecta de activación de los linfocitos a través de la presentación cruzada de antígenos por parte de las células presentadoras de antígenos que expresan en la superficie celular estas moléculas coestimuladoras (Abbas y Lichtman, 2004).

Las células madre mesenquimales son células no inmunogénicas debido a que no expresan moléculas del sistema mayor de histocompatibilidad tipo II ni moléculas coestimuladoras CD40, CD80 y CD86, aunque sí expresan moléculas del sistema mayor de histocompatibilidad tipo I (Chamberlain y col., 2007). Puesto que las células madre mesenquimales expresan las moléculas del CMH de clase I, una vez trasplantadas, podrían activar en el receptor a los linfocitos T citotóxicos que son los encargados de la destrucción de aquellas células reconocidas como extrañas. Sin embargo, debido a que

las células mesenquimales no expresan las moléculas coestimuladoras CD40, CD80 y CD86 es imposible la generación de la señal secundaria de activación, y las células T entran en un estado de anergia. Además, los linfocitos citolíticos naturales (también llamados *Natural Killers*) poseen una actividad citolítica espontánea dirigida principalmente hacia células que no expresan los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (Tyndall y col., 2007). Las células madre mesenquimales al expresar el CMH de clase I se ven, por tanto, protegidas contra este mecanismo agresivo del sistema inmune. Por otro lado, debido a que las células madre mesenquimales no expresan moléculas de histocompatibilidad tipo II tienen la capacidad de escapar al reconocimiento alorreactivo de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> cooperadores, encargados de la estimulación del crecimiento y diferenciación de los linfocitos B y de la activación de los macrófagos (Abbas y Lichtman, 2004). Todas estas características hacen que las células madre mesenquimales se describan como moduladores naturales de la respuesta inmune, desempeñando papeles importantes en procesos donde esté implicado el sistema inmune, como por ejemplo, la tolerancia en trasplantes, autoinmunidad, evasión de tumores y tolerancia feto-materna (Nauta y Fibbe, 2007).

En resumen, las células madre mesenquimales poseen unas características únicas que las convierten en candidatas idóneas para su uso en medicina regenerativa. Esto es debido a que la carencia de CMH clase II y moléculas coestimuladoras CD40, CD80 y CD86 les permite escapar a los mecanismos de inmunidad celular, consiguiendo así reducir al mínimo la posibilidad del rechazo del injerto después del trasplante. Por otro lado, las células madre mesenquimales se pueden transfectar fácilmente y con alta eficiencia (Campagnoli y col., 2002) lo que las hace candidatas ideales para su uso futuro en tratamientos de terapia génica. Por ello, en los últimos años ha habido un gran interés en el uso de las células madre mesenquimales como una herramienta importante en investigación y en estudios clínicos. Debido a las características anteriormente descritas, las células madre mesenquimales son unas candidatas idóneas para los tratamientos de medicina regenerativa, sin embargo, su escasa representación en la médula ósea y el riesgo que supone para el donante su obtención hace que la comunidad científica busque recursos alternativos de obtención de células madre mesenquimales. La placenta a pesar de su origen embrionario se considera como un tejido adulto que puede representar una

fuente importante de obtención de células madre adultas sin riesgos para el donante al ser un tejido que es desechado después del nacimiento.

### **3.- La Placenta Humana: estructura y función.**

La reproducción sexual en el océano sólo necesita la fusión de los gametos femenino y masculino, combinada con la absorción de nutrientes y oxígeno desde el ambiente acuoso circundante. En un momento determinado de la historia evolutiva, la vida se desplazó desde el mar hacia la tierra, y las estrategias reproductivas demandaron una compensación por la pérdida de este ambiente acuoso. Los mamíferos y otros pocos animales desarrollaron la placenta como mecanismo para la extracción de nutrientes y oxígeno a partir de su ambiente. Desde el punto de vista de la relación materno-fetal, la placenta será tanto más compleja cuanto mayores sean los requerimientos fetales y esta complejidad se relaciona directamente con la duración del periodo gestacional (Harvey, 2000).

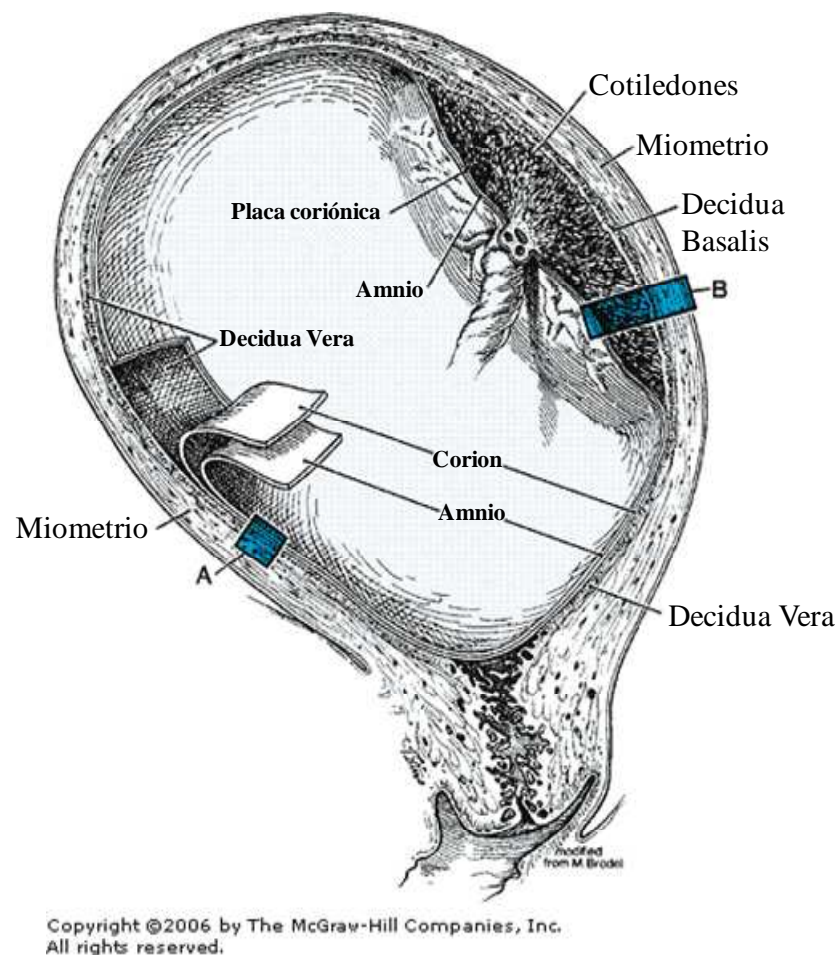
La placenta es el órgano principal para la nutrición del embrión durante el periodo de gestación y su función principal es la de poner en contacto la sangre materna con la sangre fetal, consiguiendo un correcto y continuo intercambio de gases y nutrientes entre ambas circulaciones. La placenta humana se compone por dos estructuras principales: **el corion frondoso** (también conocido como villi coriónico o placa coriónica), encargado principalmente de la circulación placentaria y **el saco amniótico**, cuya principal función es la creación de la cavidad amniótica que sirve de protección al embrión durante su desarrollo. En íntima asociación con ambas estructuras existe la denominada **interfase materno-fetal** que es la encargada de la tolerancia feto-materna, así como, de la protección de las estructuras uterinas frente a la invasión por parte del embrión en desarrollo (Cunningham y col., 2005).

La fecundación en humanos se produce en las trompas de Falopio, al igual que los estadios iniciales de desarrollo en los que el óvulo fecundado o cigoto se convierte en la mórula. La mórula consta de una capa protectora conocida como membrana pelúcida que rodea a una masa interna de 12 a 16 células generadas mediante mitosis sucesivas del cigoto originario. La mórula alcanza la cavidad uterina tres días después de la fecundación y es aquí donde se forma una cavidad interna denominada blastocele, conformándose así el blastocisto. Durante la formación del blastocisto sucede la primera

diferenciación celular, mediante la cual se genera la masa celular interna o embrioblasto, que dará origen al embrión trilaminar, y una capa celular de superficie o trofoblasto que formará todas las estructuras extraembrionarias, incluida la placenta. El blastocisto abandona la membrana pelúcida y toma contacto con la cara apical del epitelio uterino comenzando así el proceso de implantación. Durante este proceso, el trofoblasto realiza un proceso invasivo en la membrana uterina, estableciendo un fino contacto entre la madre y el feto y permitiendo así el desarrollo de la placenta que es imprescindible para el desarrollo embrionario posterior. Durante la implantación, las células estromales del endometrio uterino sufren un proceso denominado **decidualización**, causado por la acción de sustancias hormonales que son segregadas por el ovario. Dicho proceso provoca cambios histológicos que son necesarios para la protección materna de la invasión potencialmente agresiva del trofoblasto que migra hacia las arterias espirales uterinas (Smith-Agreda y col., 1992). Se forma así una densa matriz celular que se conoce como **decidua**. La decidua constituye una barrera física que protege a la madre mediante la liberación local de citocinas, creando un ambiente que promueve más el anclaje del trofoblasto que la invasión por parte de éste. Por tanto, la decidua es el tejido materno que tapiza el útero gestante entrando en íntimo contacto con las células del feto y que constituirá la interfase materno-fetal (Dunn y col., 2003).

La decidua humana presenta una apariencia gruesa y una existencia efímera ya que se desprende del resto del útero después del nacimiento. Al final del embarazo, la decidua de la placenta humana a término se clasifica en dos regiones, dependiendo de su localización anatómica (Figura 4):

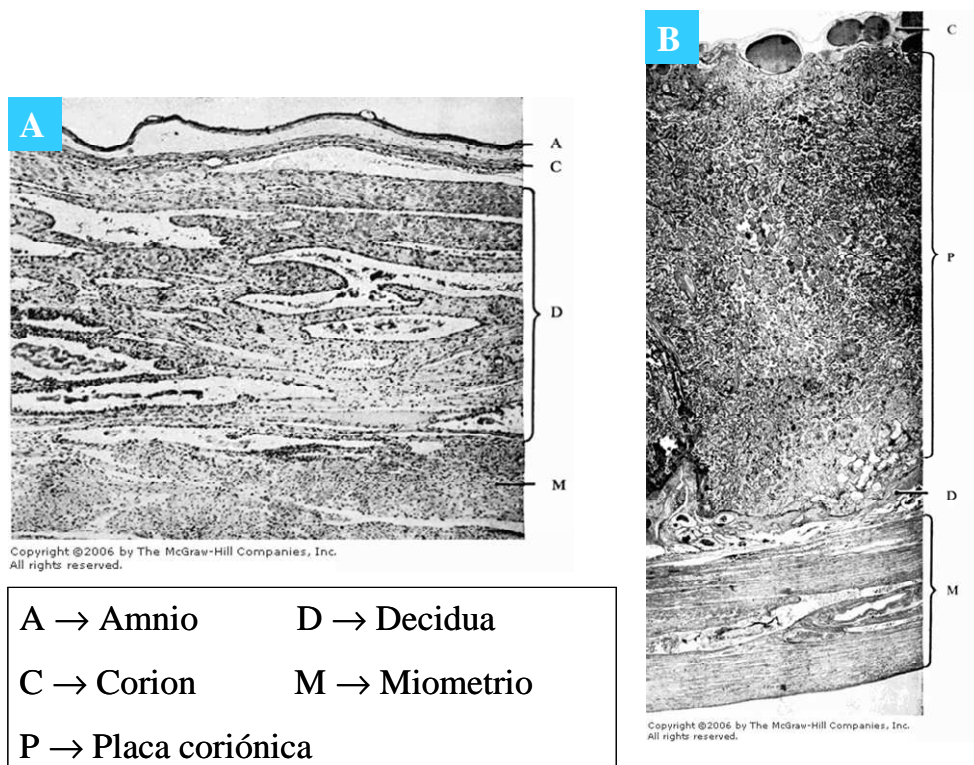
- Decidua basalis: Se localiza justo debajo del lugar de implantación del blastocisto donde se ha formado la placa coriónica.
- Decidua vera o decidua parietalis: Recubre completamente el saco embrionario, tomando contacto directo con las membranas fetales y con el miometrio uterino. Surge de la fusión de la decidua capsularis, que recubre al embrión en crecimiento, con la decidua parietalis, que tapiza las paredes uterinas durante las primeras fases de la gestación.



**Figura 4.- Estructura macroscópica de la placenta humana.** (A) Saco amniótico y (B) placa coriónica. (Modificado de Cunningham y col., 2005).

Diversos estudios *in vitro* han mostrado que células obtenidas del trofoblasto embrionario del primer trimestre de gestación presentan una elevada capacidad para invadir las matrices extracelulares (Aplin, 1991). Este hecho ha llevado a postular que el tejido decidual podría tener una composición especializada tanto para protegerse a sí mismo, como para restringir, o al menos direccionar, el potencial invasivo del trofoblasto (Aplin, 1991). No se conocen completamente los mecanismos implicados en la tolerancia feto-materna, pero la localización anatómica de la decidua parece jugar un papel importante en este proceso, al separar los tejidos fetales del miometrio uterino subyacente (Figura 5).



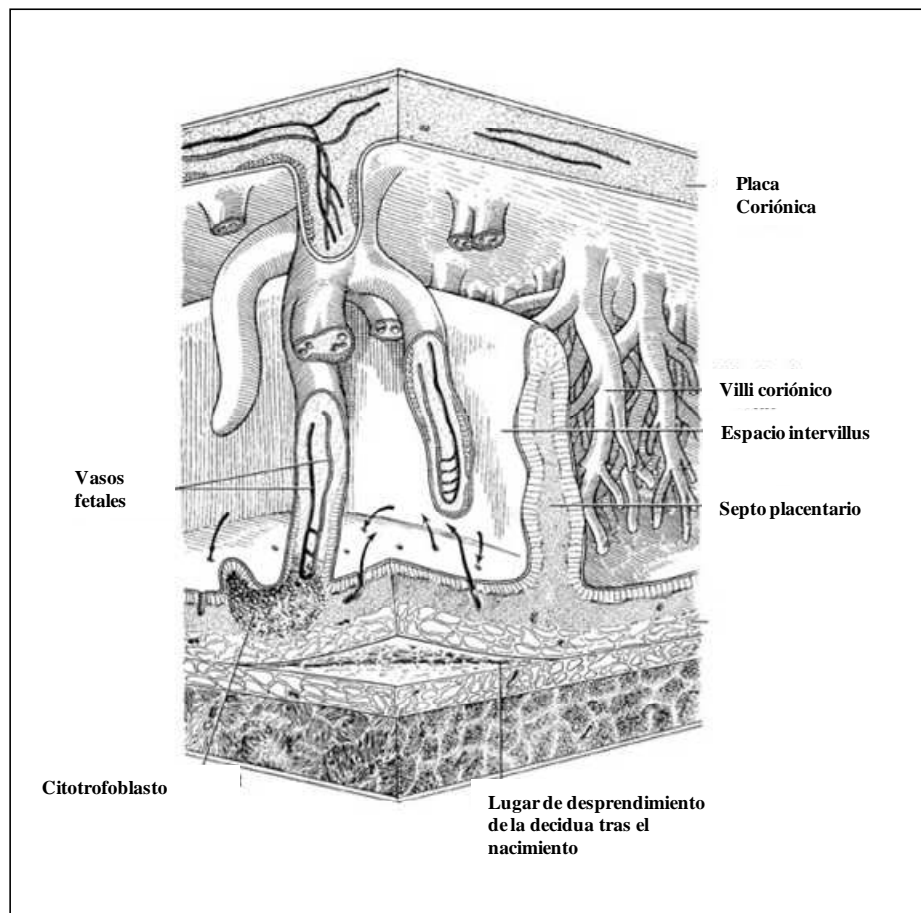


**Figura 5.- Histología de la placenta humana.** (A) Corte transversal del saco amniótico. (B) Corte transversal de la placa coriónica. (Modificado de Cunningham y col., 2005).

Además de la decidua, la placenta humana, se compone también de otras dos estructuras de origen fetal que se mantienen en íntimo contacto con esta durante toda la gestación, que son el corion frondoso o villi coriónico y el saco amniótico. El corion frondoso presenta una estructura de tipo hemocorial, mediante la cual los vasos sanguíneos fetales se ponen en contacto directo con la sangre materna. La sangre materna se concentra en las lagunas o espacios intervillus y baña directamente los vasos sanguíneos fetales que se extienden desde de la placa coriónica (Figura 6) (Grosser, 1933; Fox, 1991 y Smith-Agreda y col., 1992).

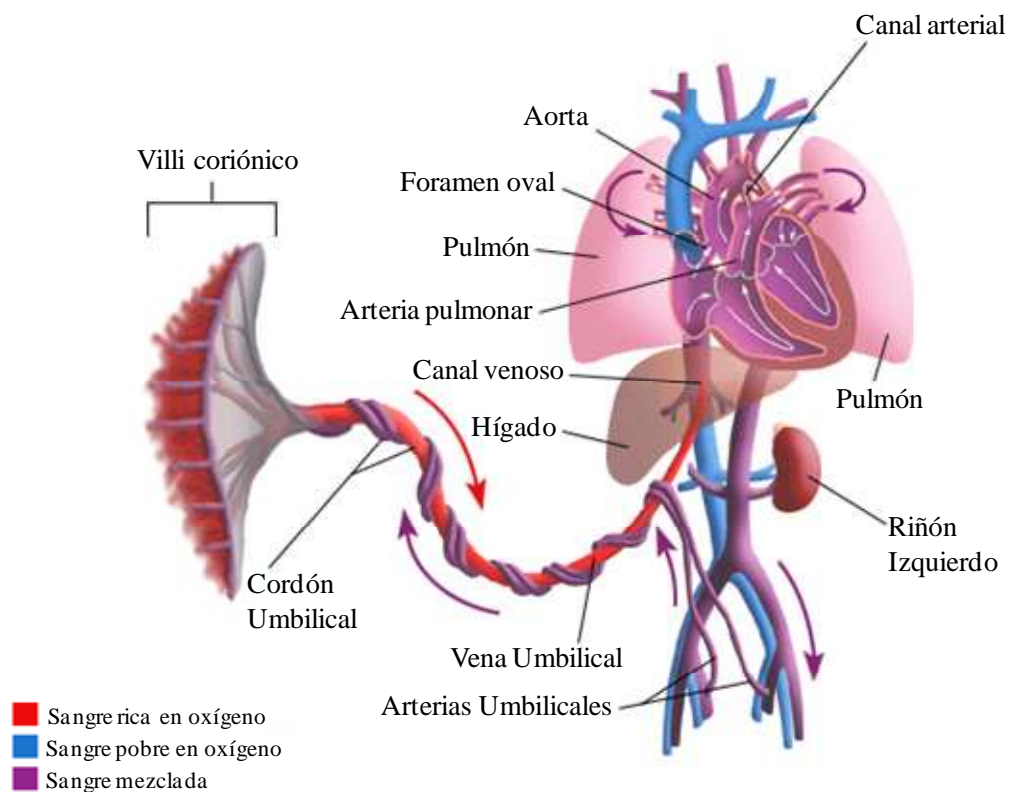
Desde la placa coriónica o corion frondoso, la sangre oxigenada y rica en nutrientes se dirige al embrión a través del **cordón umbilical**, que anatómicamente se considera como parte de las membranas fetales (Cunningham y col., 2005). El cordón umbilical consta de dos arterias y una vena umbilicales que se enrollan en espiral, quedando inmersas en una gelatina translúcida, denominada gelatina de Wharton. El cordón

umbilical se forma alrededor de la quinta semana de gestación y surge a partir del saco vitelino y el alantoides primitivos, aunque también incluye a la unión amnio-ectodérmica y algunos pliegues intestinales endodérmicos. Se trata de una estructura altamente compleja que se encarga de llevar la sangre desde la placenta hasta el interior del embrión en desarrollo a través de los canales venoso y arterial (también llamados ductus venoso y ductus arterial, Figura 7) (Sadler, 2004).



**Figura 6.- Estructura de la placa coriónica o corion frondoso de la placenta humana.**  
 Modificado de *Bioquímica Perinatal*. Por: Jairo Alfonso Tovar Franco.  
<http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/perinatal/programa2004.html>

El saco amniótico tiene como función principal la creación de la cavidad amniótica que proporciona protección al embrión durante su desarrollo. Este saco embrionario se compone de tres membranas: el amnio, el corion y la decidua materna (Figura 8). La membrana amniótica nunca tomará contacto con la decidua materna y su función

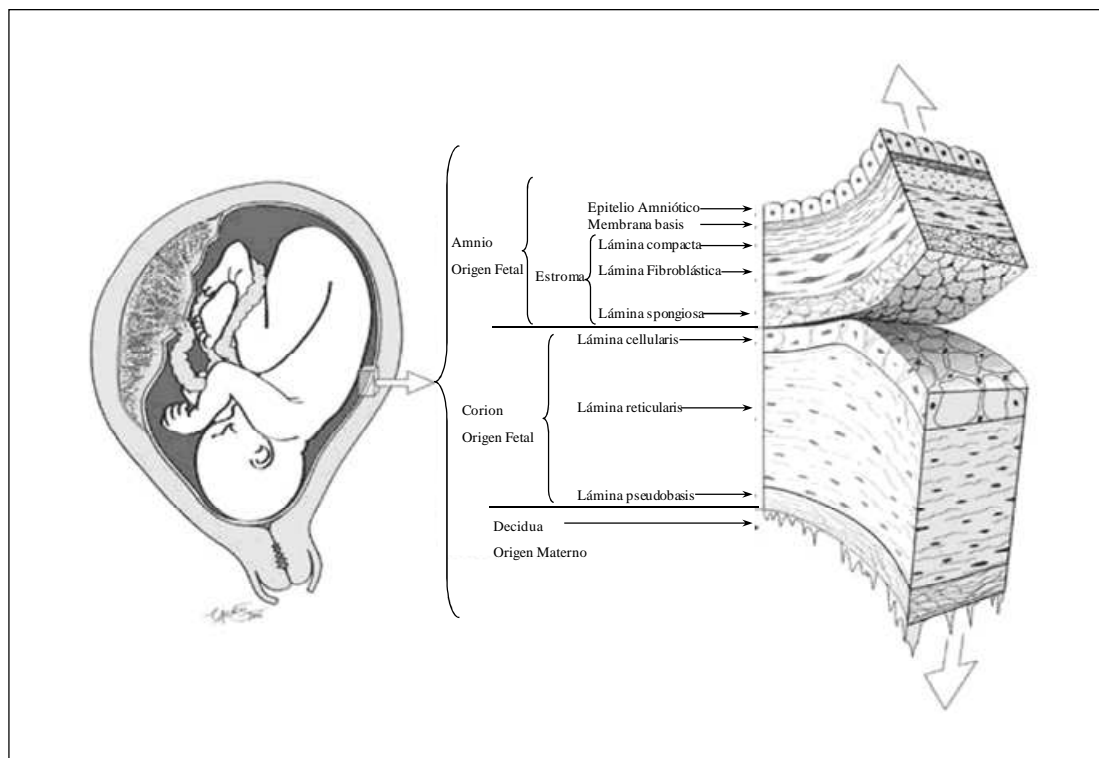


**Figura 7.- Representación esquemática de la circulación fetal.** El cordón umbilical conecta el corion frondoso, lugar de intercambio de gases y nutrientes, con los vasos fetales a través del canal venoso y arterial. Modificado de <http://www.lpch.org/DiseaseHealthInfo/HealthLibrary/hrnewborn/0181-pop.html>.

principal va a ser sostener y proteger al embrión, manteniendo, gracias al líquido amniótico, el ambiente acuoso necesario para un correcto desarrollo. La membrana coriónica, al contrario que la amniótica, permanece en íntimo contacto con la decidua materna desde su formación, y su función principal es la secreción de la hormona gonadotropina coriónica que asegura la continuidad del embarazo (Sadler, 2004).

La cavidad amniótica creada por las membranas fetales, se encuentra llena de un fluido claro que principalmente deriva de la sangre materna aunque las células amnióticas también contribuyen, en parte a su producción. Este fluido se denomina **líquido amniótico** y su principal función es la protección mecánica del embrión durante la gestación. El volumen de líquido al final del embarazo suele alcanzar los 1000 mL, renovándose cada tres horas, y sus funciones durante la gestación consisten en absorber

sacudidas, prevenir la adherencia del embrión al amnio y permitir los movimientos fetales (Sadler, 2004).



**Figura 8.- Estructura del saco amniótico.** Modificado de Placenta, cordón umbilical y membrana amniótica en oftalmología. Por: Murube J, Rivas L, Rebolleda G, Candela I, Murube I, Sales-Sanz M, García Pérez J, Barroso E, Chenzhuo L. <http://www.oftalmo.com/studium/studium2006/stud06-2/06b-11.htm>.

Debido a que la placenta es un tejido que presenta una composición mayoritariamente fetal, muchos grupos de investigación en el mundo la han propuesto como un recurso alternativo para la obtención de células madre adultas. El hecho de que sea un tejido de fácil acceso ya que se desecha después del parto, ha dado lugar a la publicación de diversos estudios en los que se han obtenido células madre adultas a partir de las distintas partes que lo conforman.

### 3.1.- Células madre obtenidas de la placenta humana.

Se han obtenido varios tipos de células madre a partir de las distintas estructuras que componen la placenta, con la ventaja de que carecen de implicaciones éticas pues la placenta es un tejido que se desecha después del nacimiento. A continuación se ofrece

un breve resumen de las características de los tipos de células madre derivados de la placenta.

### **3.1.1.- Células madre derivadas de la placa o villi coriónico.**

El villi coriónico es el principal encargado de la circulación sanguínea feto-materna y es donde se produce el intercambio gaseoso y de nutrientes que permite el correcto desarrollo embrionario. Esta estructura corresponde al 80% del peso de la placenta a término, por lo que es particularmente atractiva como recurso de células madre. Mediante digestión enzimática se ha obtenido una población de células que se adhiere al plástico de la placa de cultivo y que se ha denominado **células madre derivadas de la placenta** (PDSC, siglas de su nombre en inglés *Placenta-derived stem cells*). Estas células presentan una morfología de fibroblasto y expresan numerosos marcadores de superficie característicos de las células madre mesenquimales, entre ellos CD29 y CD44. Además, expresan los marcadores de pluripotencia Oct-4 y Rex-1. Al igual que las células madre mesenquimales de la médula ósea también expresan, de forma constitutiva y simultánea, genes característicos de las tres capas germinales, lo cual sugiere que estas células van a presentar una elevada plasticidad (Fukuchi y col., 2004). Las células derivadas de la placa coriónica son altamente proliferativas y pueden mantenerse en cultivo durante más de 20 pases (Fukuchi y col., 2004 y Chang y col., 2007). Bajo las condiciones de cultivo adecuadas se diferencian *in vitro* hacia células derivadas de las tres capas germinales (Fukuchi y col., 2004; Igura y col., 2004 y Chang y col., 2007). Estas características indican que estas células derivadas de la placa coriónica componen una población de verdaderas células madre adultas.

### **3.1.2.- Células derivadas del cordón umbilical.**

La sangre de cordón umbilical se ha utilizado desde hace más de veinte años como alternativa a la médula ósea para la obtención de células madre hematopoyéticas. La sangre de cordón umbilical, presenta la ventaja frente a la médula ósea, de que su obtención después del parto no supone ningún riesgo para la madre ni para el bebé. Las células madre hematopoyéticas presentes en la sangre de cordón umbilical se han utilizado a nivel clínico en el tratamiento de varias enfermedades hematológicas (Laughlin y col., 2001; Cohen y Nagler, 2003; Ooi, 2006; Hayani y col., 2007 y Brown y Boussiotis, 2008). La presencia de células madre mesenquimales en la sangre de

cordón es un tema que no está del todo aclarado, pues mientras que algunos investigadores reportan su aislamiento de forma sencilla y en elevadas cantidades (Erices y col., 2000; Goodwin y col., 2001; Bieback y col., 2004 y Lee y col., 2004), existen otros grupos que no las obtienen o las obtienen en muy bajas cantidades (Mareschi y col., 2001; Romanov y col., 2003 y Wexler y col., 2003). Recientemente, algunos grupos han mostrado el aislamiento de células con características de células mesenquimales a partir de la gelatina de Wharton del cordón umbilical, y que se han denominado **células madre de la matriz del cordón umbilical** (UCMSCs siglas de su nombre en inglés *Human umbilical cord stroma cells*). Se han aislado alrededor de  $4 \times 10^5$  células madre mesenquimales por cada gelatina de cordón (Karahuseyinoglu y col., 2007), un número significativamente superior al número de células madre mesenquimales presentes en la médula ósea. Estas células expresan en su superficie CD29, CD90, CMH clase I, pero sin embargo, son negativas para CMH clase II lo que recuerda al fenotipo mesenquimal (Sarugaser y col., 2005; Weiss y col., 2006; Secco y col., 2008 y Troyer y Weiss, 2008). Por otro lado, estas células se expanden en cultivo durante más de ochenta divisiones celulares y expresan varios marcadores relacionados con la plasticidad de las células madre como son c-kit, Nanog, Oct-4 y Sox-2 (Mitchell y col., 2003; Sarugaser y col., 2005 y Weiss y col., 2006). Estas células muestran una elevada plasticidad *in vitro*, siendo capaces de diferenciarse hacia el linaje mesodérmico y ectodérmico (Mitchell y col., 2003; Wang y col., 2004; Conconi y col., 2006 y Secco y col., 2008). Dentro de este último linaje se ha descrito incluso la formación de neuronas dopaminérgicas con un elevado interés clínico (Fu y col., 2006).

### **3.1.3.- Células derivadas del líquido amniótico.**

Desde hace más de 70 años el líquido amniótico se está utilizando en el diagnóstico prenatal de determinadas enfermedades genéticas. Recientemente se ha sugerido, que el líquido amniótico puede servir además como una vía de obtención de células madre fetales. Sin embargo, el líquido amniótico se obtiene mediante un procedimiento invasivo (amniocentesis) que genera riesgos para el embrión en desarrollo. El líquido amniótico contiene una población heterogénea de células que presenta un amplio rango de morfologías diferentes, desde células fetales de piel, urogenitales, respiratorias y digestivas. Existe además, un tipo de célula proveniente de la membrana amniótica que se han denominado **células multipotentes del líquido amniótico o células mesenquimales del líquido amniótico** (Marcus y Woodbury, 2008). Estas células

madre se expanden en cultivo durante más de sesenta divisiones celulares, debido a la elevada actividad de la enzima telomerasa que presentan en los primeros pases del cultivo, aunque esta actividad va desapareciendo progresivamente durante el proceso de cultivo. Estas células expresan en su superficie marcadores de células mesenquimales como CD44 y CD54, pero también expresan los antígenos SSEA-3, SSEA-4, TRA-160 y TRA-1-81 relacionados con las células embrionarias y fetales. De forma similar a las células derivadas de otras partes de la placenta y a las células mesenquimales de médula ósea, las células multipotentes del líquido amniótico presentan un inmunofenotipo de tipo CMH clase I positivo y CMH clase II negativo. En estudios de diferenciación *in vitro* se ha demostrado que estas células presentan la capacidad de diferenciarse hacia células derivadas de las tres capas germinales (Bossolasco y col., 2006; De Coppi y col., 2007 y Kim y col., 2007). Un estudio publicado por De Coppi y col., muestra como las células madre derivadas del líquido amniótico son capaces de diferenciarse hacia células de las tres capas germinales, y que estas células especializadas exhiben características funcionales, e incluso son capaces de injertarse y mantener su funcionalidad en tejidos de ratones inmunodeficientes (De Coppi y col., 2007).

#### **3.1.4.- Células derivadas de la membrana amniótica.**

La membrana amniótica deriva directamente del epiblasto embrionario en las primeras etapas del desarrollo. Por lo tanto, la membrana amniótica tiene un desarrollo temprano a partir de células multipotentes que podrían quedar secuestradas en el amnio, permaneciendo intactas hasta el final del embarazo. Por esta razón la membrana amniótica ha sido objeto de multitud de estudios en busca de células madre (Marcus y Woodbury, 2008). A partir de esta membrana se han aislado tres poblaciones diferentes de células madre: células epiteliales del amnio, células mesenquimales amnióticas y células madre derivadas del amnio. Estas tres poblaciones celulares tienen algunas características comunes, pero difieren en muchos aspectos.

La población mejor caracterizada es la de las **células epiteliales del amnio**. *In vitro*, estas células presentan morfología epitelial y crecen formando grupos de células pseudoadherentes a la placa de cultivo. Estas células son positivas para los marcadores de células embrionarias SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 y TRA-1-81. Además, estas células expresan los genes Sox-2, Oct-4, Nanog y Rex-1 que se asocian con la pluripotencia en las células embrionarias. De acuerdo con esto se ha demostrado la

capacidad de diferenciación *in vitro* de las células del amnio hacia células de las tres capas germinales (Miki y col., 2005). Por otro lado, estas células no expresan la enzima telomerasa lo que es consistente con su limitada capacidad de proliferación, parecen ser células inmunoprivilegiadas, puesto que no expresan moléculas en su superficie del complejo mayor de histocompatibilidad (Akle y col., 1981) y secretan además una serie de factores inmunosupresores capaces de modular la respuesta inmune. Todos estos datos hacen que las células epiteliales del amnio sean muy atractivas desde el punto de vista de trasplante celular (Li y col., 2005 e Ilancheran y col., 2009).

Las **células mesenquimales amnióticas** residen en la cara más externa del amnio que se encuentra yuxtapuesta a la membrana coriónica. De forma similar a las células epiteliales del amnio, presentan muy baja o nula expresión de los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad, por lo que podrían ser toleradas en un trasplante. Igualmente, mediante estudios de diferenciación *in vitro*, se ha demostrado su capacidad para generar células de las tres capas embrionarias (Tamagawa y col., 2007).

Las **células madre derivadas del amnio** sólo se han aislado y caracterizado a partir de estudios en roedores. Estas células se caracterizan por ser positivas para marcadores como CD90 y CD29 característicos de células mesenquimales y para los genes Sox-2 y Nanog, relacionados con plasticidad. Por otro lado, presentan elevada actividad telomerasa, llegando a mantener hasta cincuenta pases en cultivo. Estas células expresan genes de las tres capas embrionarias de forma constitutiva lo que sugiere que van a presentar una elevada plasticidad. Cuando se las somete a los estímulos adecuados *in vitro*, también son capaces de generar células de las tres capas embrionarias como osteoblastos, neuronas y hepatocitos (Marcus y col., 2008).

### **3.1.5.- Células derivadas de la membrana coriónica.**

A diferencia de la membrana amniótica, existen pocos estudios dedicados a la obtención y caracterización de células madre a partir de la membrana coriónica. Las células madre obtenidas de la membrana coriónica se han denominado **células mesenquimales del corion** y se han aislado mediante digestión enzimática tanto del corion del primer trimestre como del corion a término (Parolini y col., 2008). Las células mesenquimales del corion presentan adherencia a la placa de cultivo y una



morfología característica de fibroblasto (Soncini y col., 2007). El fenotipo de estas células es similar al de las células mesenquimales de la médula ósea, puesto que presentan expresión de los antígenos CD166, CD105, CD90, CD73, CD49, CD44, CD29, CD13 y CMH clase I y son negativas para CD14, CD34, CD45 y CMH clase II (Portmann-Lanz y col., 2006). Desde el punto de vista de su plasticidad, estas células se han diferenciado *in vitro* hacia el linaje mesodérmico (Soncini y col., 2007) y ectodérmico (Portmann-Lanz y col., 2006 y Portmann-Lanz y col., 2010).

### 3.1.6.- Células derivadas de la decidua materna.

La decidua humana se ha utilizado principalmente para la obtención de células uterinas que han servido como modelo para el estudio del proceso de decidualización humana (Strakova y col., 2008). Sin embargo, este tejido se considera actualmente como una fuente alternativa de células madre gracias a los estudios, cada vez más numerosos, que se han publicado en los últimos años. Hasta la fecha se han descrito varias poblaciones celulares con características de células madre provenientes de distintas partes y momentos del desarrollo de la decidua humana.

Existe una población denominada **células deciduales estromales** que puede aislarse tanto de la decidua del primer trimestre de embarazo, como de la decidua a término. Las células deciduales estromales se aíslan, principalmente de la decidua basalis, presentan una morfología tipo fibroblasto, crecen adheridas a la placa de cultivo y se mantienen en cultivo durante un periodo variable de tiempo. Las características fenotípicas son similares a las de las células madre mesenquimales de la médula ósea puesto que expresan los marcadores CD90, CD105, CD44, CD73, CD29 y CMH clase I. Además, son negativas para los marcadores hematopoyéticos CD34 y CD45 y para las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II. Estas células presentan la capacidad de diferenciarse *in vitro* hacia células del linaje mesodérmico típico (adipogénico, osteogénico y condrogénico) así como del linaje endodérmico (In 't Anker y col., 2004; Barlow y col., 2008 y Dimitrov y col., 2010).

Por otro lado, se ha aislado una nueva población de células con características de células madre de la decidua basalis humana a término denominada **células madre mesenquimales de la decidua basalis placentaria** dado su parecido fenotípico con las células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea. Esta población tiene en

común con las células deciduales estromales el ser positiva para los marcadores CD29, CD44, CD105 y para las moléculas del sistema mayor de histocompatibilidad clase I y negativa para CD34 y CMH de clase II. Además, estas células son positivas para otros dos marcadores característicos de las células de tipo mesenquimal que son CD166 y CD9. Por otro lado, estas células expresan marcadores característicos de las células embrionarias como son SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 y TRA-1-81 y el marcador directamente relacionado con plasticidad, Oct-4. Los estudios *in vitro* muestran que estas células son capaces de diferenciarse hacia el linaje mesodérmico típico y además son capaces de resistir condiciones de hipoxia y de privación de suero (Huang y col., 2009).

A partir del septo placentario, localizado en el interior del villi coriónico y compuesto por tejido decidual (Figura 6, Cunningham y col., 2005) se ha aislado, recientemente, una población de células con características de células mesenquimales denominada **células madre mesenquimales derivadas de la placenta**. Estas células se expanden en cultivo durante veinte pases, manteniendo un cariotipo estable y son positivas para los marcadores de células mesenquimales CD44, CD73, CD90, CD105 y CD166, los marcadores del complejo mayor de histocompatibilidad clase I, el antígeno embrionario SSEA-3, el marcador CD133 (relacionado con células progenitoras tempranas) y marcadores de células diferenciadas como el factor de von Willebrand (característico de células endoteliales) y  $\alpha$ -actina de músculo liso. Por otro lado, estas células son negativas para los marcadores hematopoyéticos CD34 y CD45, el marcador CD117, el marcador de pluripotencia Oct-4, los marcadores embrionarios SSEA-4, TRA-1-60 y TRA-1-81, y los antígenos de histocompatibilidad de clase II, entre otros. Además, este trabajo demuestra también la capacidad de las células de diferenciarse *in vitro* hacia la línea mesodérmica típica, así como hacia el linaje endotelial (Semenov y col., 2010).

A partir de la decidua humana a término, se han aislado también, células con características de células madre, que difieren de las células de tipo mesenquimal. Estas células han sido denominadas **fibroblastos uterinos** y se aíslan de la decidua parietalis humana. Estas células expresan marcadores típicos de los miofibroblastos como actina de músculo liso, calpoina y la cadena ligera de la miosina kinasa lo que implica una similitud con los miofibroblastos. Además, estas células expresan el marcador hematopoyético CD34 y los marcadores de plasticidad SSEA-1, SSEA-4, Oct-4, Stro-1

y TRA-1-81. Este estudio demuestra además la capacidad de estas células para diferenciarse hacia los linajes mesodérmicos típicos (Strakova y col., 2008).

En el presente trabajo está basado en el aislamiento y la caracterización desde el punto de vista fenotípico y molecular de una población de células adherentes obtenidas a partir del saco amniótico de la placenta humana.



### III.-OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO.



### **OBJETIVOS:**

Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio muestran la existencia de unas células con morfología de fibroblasto en las membranas que componen el saco amniótico de la placenta. El objetivo de nuestros estudios es el análisis exhaustivo de este tipo celular y el estudio de su plasticidad. Durante el desarrollo de este trabajo, los objetivos que se pretenden abordar son:

- 1.- Análisis del fenotipo de las células con forma de fibroblasto obtenidas de las membranas que componen el saco amniótico de la placenta humana.
- 2.- Estudio de las características moleculares de estas células.
- 3.- Estudio del origen materno o fetal de las células y su procedencia trofoblástica o epiblastica.
- 4.- Estudio de la capacidad multipotencial de las células en estudios *in vitro* y en cocultivos en presencia de tejido lesionado.

### **HIPÓTESIS DE TRABAJO:**

La placenta es una fuente de células madre. El presente trabajo pretende la caracterización exhaustiva de las células madre aisladas en nuestro laboratorio para determinar si estas pueden tener un uso futuro en ensayos clínicos en humanos.





## VI. MATERIAL Y MÉTODOS.



**1.- Obtención de las muestras:** Las placentas se obtuvieron mediante consentimiento informado aprobado por el Comité Ético para la Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Universitario 12 de Octubre.

**2.- Obtención de células del saco amniótico:** Las placentas procedentes de embarazos prematuros o de embarazos a término, se procesaron inmediatamente tras el alumbramiento. Para la obtención de las células, el saco amniótico se separó mecánicamente del villi coriónico con ayuda de pinzas y tijeras y el villi coriónico se descartó. Las células se obtuvieron siguiendo el protocolo de Miki y col., 2005 pero con importantes modificaciones introducidas en nuestro laboratorio. En primer lugar el saco amniótico se lavó con Tampón Fosfato Salino 1X (PBS, Sigma) y las células se obtuvieron mediante dos digestiones de treinta minutos cada una con 0,05% de tripsina -Versene (Lonza), que contiene 0,53mM de Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA). Las células resultantes de ambas digestiones, se lavaron dos veces en PBS 1X y se recogieron mediante centrifugación de diez minutos a 400 xg. Finalmente, el sedimento celular obtenido, se resuspendió en 1 mL de PBS 1X con 2 mM de EDTA (Sigma) y 0,5% de albúmina humana (Grifols).

Los eritrocitos presentes en el sedimento celular obtenido se lisaron durante quince minutos en un tampón de lisis que contiene 0,8% de cloruro de amonio (Sigma) y 0,1 mM de EDTA (Sigma) a un pH de 7,4, a temperatura ambiente y oscuridad. Posteriormente, con el fin de eliminar la hemoglobina libre y los restos celulares obtenidos del proceso de lisis, se realizaron dos lavados con PBS 1X y las células se recogieron mediante centrifugación de diez minutos a 400 xg. Las células obtenidas se resuspendieron en 1 mL de PBS 1X con 2 mM de EDTA y 0,5% de albúmina humana. Las células se contaron en cámara de Neubauer y se sembraron a una densidad de  $1,16 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> en el medio de cultivo compuesto por Medio Esencial Dulbecco Modificado (DMEM, Lonza), 2 mM de glutamina, 1 mM de piruvato sódico, 10 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF, Sigma), 10% de suero bovino fetal (Lonza), 1% de antibióticos (Penicilina-Estreptomicina 10.000 Unidades, Lonza), 1% de aminoácidos no esenciales (Lonza) y 55  $\mu$ M de  $\beta$ -mercaptoetanol (Sigma) y se mantuvieron en un incubador a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

**3.- Mantenimiento de los cultivos:** Las células no adherentes se retiraron a los cinco días del inicio de los cultivos mediante aspiración del medio de cultivo y lavado con PBS 1X (Lonza). El medio de cultivo se reemplazó cada cuatro días hasta que las células alcanzaron un 90-100% de confluencia (aproximadamente 20 días después de iniciado el cultivo). En este momento, las células se despegaron de la placa de cultivo mediante digestión con tripsina-Versene durante cinco minutos a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> y se sembraron a una concentración de  $3-4 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>.

#### **4.- Estudio de la procedencia materno-fetal:**

**4.1.- Hibridación *in situ* fluorescente (FISH):** Para realizar este estudio se contrataron los servicios de la empresa Gemolab que utilizó el *Poseidon FISH Kit* (Kreatech). De acuerdo a las instrucciones del kit, las células se crecieron adheridas en un cubreobjetos estéril y una vez alcanzado el 70% de confluencia en el cultivo, se lavaron con PBS durante diez minutos a 37°C y se fijaron con Fijador de Carnoy (metanol: ácido acético, 3:1) fresco durante diez minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se permeabilizaron durante 15 minutos a 37°C en tampón de permeabilización (0,5% de Igepal CA-630 (Sigma) diluido en citrato sódico salino 2X (SSC 2X)) y se deshidrataron mediante la incubación en una serie de etanol 70%, 85% y 100% de un minuto cada una. Las células se incubaron con 10 µL de las sondas fluorescentes (*Poseidon repeat-free XY probes*) a 75°C durante diez minutos para desnaturalizar tanto el ADN celular como las sondas y se incubaron a 37°C en una cámara húmeda durante toda la noche para permitir la hibridación de la sonda con el ADN celular. A continuación, las células ya hibridadas se lavaron en presencia de tampón de lavado I (0,3% de Igepal en 0,4% de SSC, contenido en el *Poseidon FISH Kit*, Kreatech) durante dos minutos a temperatura ambiente y con agitación. Seguidamente, la muestra se lavó en este mismo tampón durante dos minutos a 72°C sin agitación. Finalmente, la muestra se lavó en tampón de lavado II (0,1% de Igepal en SSC 2X, contenido en el *Poseidon FISH kit*, Kreatech) durante un minuto a temperatura ambiente y sin agitación. La muestra se deshidrató nuevamente, mediante una serie de etanol 70%, 85% y 100% de un minuto cada una y se secó a temperatura ambiente. Los núcleos de las células se tiñeron con 0,2 µg/mL de 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Fluka) durante un minuto a temperatura ambiente y oscuridad. Finalmente, las células se visualizaron mediante microscopía de fluorescencia.

**4.2.- Estudio de repeticiones cortas en tándem (STRs del inglés *short tandem repeats*):** Este estudio se realizó en la empresa Gemolab que utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa fluorescente (QF-PCR) con el kit *Aneufast<sup>TM</sup> QF-PCR* (Molgentix). Esta técnica permite detectar la presencia o ausencia de un determinado fragmento cromosómico mediante el uso de sondas fluorescentes. Siguiendo las instrucciones del kit *Aneufast<sup>TM</sup> QF-PCR* se realizó un estudio múltiple de cinco marcadores cuyo tamaño y localización cromosómica se detallan en la tabla 1.

Marcador	Localización Cromosómica	Alelos conocidos (pb)
AMXY	Xp22.1-22.31 Yp11.2	X 104 Y 109
SRY	Yp11.2	Y 463
X22	Xq28 Yq (PAR2)	189-194-199-204-209-214-219-224-226-229-234-239-242-247- 253
DXYS218	Xp22.32 Yp11.3 (PAR1)	266-270-274-278-282-286-290-294
HPRT	Xq26.1	264-268-272-276-278-280-284-288-292-296-300-313

**Tabla 1.- Tamaños y localización cromosómica de los marcadores utilizados en la técnica de QF-PCR.**

La mezcla de reacción se realizó según las instrucciones indicadas por el fabricante del kit *Aneufast<sup>TM</sup> QF-PCR* y el ciclo termal se llevó a cabo en un analizador genético 3100, con tecnología basada en electroforesis capilar (Applied Biosystems) de acuerdo al protocolo publicado por Mann y col. en 2001.

**5.- Dinámica de la población:** La dinámica de crecimiento de los cultivos se determinó mediante el recuento de las células en una cámara de Neubauer en cada pase. El número de duplicaciones celulares se calculó mediante la fórmula:  $N_t = N_0 \times 2^d$ , donde  $N_t$  es el número de células a tiempo  $t$ ,  $N_0$  es el número de células iniciales y  $d$  el número de divisiones celulares que han sucedido a lo largo del cultivo (en un tiempo  $t$ ). Los datos obtenidos de nueve placentas diferentes se analizaron con el programa informático Microsoft Excell® para la obtención de la media y la desviación estándar de los parámetros tiempo de generación, tiempo de cultivo, número de pases y número de

divisiones celulares y los gráficos se han construido con el programa informático SigmaPlot® V 11.0 (Sigma).

**6.- Citometría de flujo:** Para el análisis por citometría de flujo se obtuvieron suspensiones de células mediante digestión con tripsina-Versene. Las células se resuspendieron en PBS 1X con 2% de Suero de caballo a una concentración de  $5 \times 10^5$  células por cada 100  $\mu$ l de tampón. Las células se tiñeron con los anticuerpos específicos para los marcadores humanos CD45 PerCP (BD Pharmingen), CD34 FITC, CD133/1 PE (Miltenyi), CD105 FITC (Serotec), BCRP1 FITC (Millipore), CD73 PE, CD29 PE, CD44 FITC, CD117 PE, CD90 FITC y CD13 PE (BD Pharmingen), HLA-ABC FITC (MHC clase I), HLA-DR FITC (MHC clase II), CD40 FITC, CD80 (B7-1) FITC, CD86 (B7-2) PE, SSEA-1 PE, SSEA-3 PE, SSEA-4 PE TRA-1-60 PE y TRA-1-81 PE (eBioscience). Para calcular y corregir la unión inespecífica de los anticuerpos se realizó el análisis de los isotipos control para cada marcador. Los isotipos examinados son Ratón IgG<sub>1</sub> FITC, Ratón IgG<sub>2a</sub> FITC (Serotec), Ratón IgG<sub>1</sub> PE, Ratón IgG<sub>1</sub> PerCP, Ratón IgG<sub>2a</sub> PE (Becton Dickinson), Ratón IgG<sub>3</sub> FITC y Ratón IgM PE (eBioscience). Los anticuerpos se usaron a una concentración 1:10 ó 1:20, según las instrucciones del fabricante y tomando como referencia sus isotipos control. Las células se incubaron en presencia de los anticuerpos durante quince minutos a temperatura ambiente y oscuridad. Posteriormente, se analizaron al menos 20.000 eventos para cada marcador, en un citómetro de flujo FACScan® (Becton Dickinson) equipado con el programa informático CellQuest Pro®.

## **7.- Estudio de la capacidad de diferenciación de las células obtenidas de la placenta humana:**

### **7.1.- Diferenciación hacia el linaje mesodérmico.**

**7.1.1.- Diferenciación Adipogénica:** La diferenciación adipogénica se llevó a cabo con el *Adipogenic Differentiation Bullet Kit* (Lonza) mediante tres ciclos de inducción/mantenimiento de tres días cada uno. Cuando las células alcanzaron el 100% de confluencia, el medio de cultivo se sustituyó por el medio adipogénico de inducción (que contiene h-insulina, L-glutamina, dexametasona, indometacina y 3-isobutil-1-metil-xantina (IBMX)), y se mantuvieron durante tres días. Posteriormente, las células

se incubaron en medio adipogénico de mantenimiento (que contiene h-insulina y L-glutamina) durante otros tres días. Después de tres ciclos completos en estos medios, las células se cultivaron durante siete días en medio adipogénico de mantenimiento que fue reemplazando cada dos o tres días. Las células se fijaron con 10% de formalina (Sigma) en PBS 1X durante treinta minutos y se tiñeron con Oil Red O para detectar la presencia de vacuolas lipídicas. La tinción se visualizó mediante microscopía de contraste de fases en un microscopio Leica DMIL y las células se fotografiaron usando el sistema CoolPix compuesto por una cámara digital CoolPix 995 y una lente conversora CoolPix MDC (Nikon).

**7.1.2.- Diferenciación Osteogénica:** La diferenciación osteogénica se llevó a cabo con el *Osteogenic Differentiation Bullet Kit* (Lonza) que se compone de un medio osteogénico basal complementado con dexametasona, L-glutamina, ascorbato y  $\beta$ -glicerofosfato. Cuando las células alcanzaron la confluencia, el medio de cultivo se reemplazó con medio de diferenciación que se renovó cada dos o tres días durante un total de veintiún días. El grado de diferenciación se evaluó mediante la tinción de acúmulos de calcio extracelulares con Alizarín Red S y la presencia de fosfatasa alcalina con las tabletas SIGMAFAST<sup>TM</sup> BCIP<sup>®</sup>/NBT.

**7.1.3.- Diferenciación Condrogénica:** Una vez el cultivo alcanzó el 100% de confluencia, el medio se reemplazó por el medio de diferenciación condrogénica (*Chondrogenic Differentiation Bullet Kit*, Lonza). El medio contiene dexametasona, insulina, transferrina, selenio, ascorbato, piruvato sódico y L-Glutamina, y se complementó además con 10 ng/mL de factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1, Sigma). El medio se reemplazó con medio fresco cada dos o tres días durante veintiún días. El estado de diferenciación obtenido se evaluó posteriormente mediante inmunocitoquímica para agregán y condroitin sulfato (Tabla 2).

**7.1.4.- Diferenciación Miogénica:** Las células se sembraron en placas recubiertas de fibronectina (Sigma). Cuando las células alcanzaron la confluencia, el medio se reemplazó por medio de cultivo fresco complementado con 10  $\mu$ M de 5'-azacitidina y se incubaron durante 24 horas. Posteriormente, el medio se sustituyó por el *Skeletal Muscle Growth Medium* que contiene factor de crecimiento epitelial humano (h-EGF),

h-insulina, fetuina, dexametasona (*Skeletal Muscle Bullet Kit*, Lonza). Este medio se complementó con 10 ng/mL de factor de crecimiento de fibroblasto-básico (FGF-básico) (Sigma). El cultivo se mantuvo bajo estas condiciones de siete a catorce días con cambios frecuentes del medio de cultivo. La diferenciación muscular se evaluó mediante inmunofluorescencia para las proteínas  $\alpha$ -actinina y SK-miosina (Tabla 2).

**7.1.5.- Diferenciación Cardíaca:** La diferenciación cardíaca se realizó siguiendo el protocolo descrito para la diferenciación muscular, excepto que el medio de diferenciación se mantuvo durante cuarenta y cinco días. La diferenciación cardíaca se evaluó mediante inmunofluorescencia para la proteína atrial natriurética (ANP) (Tabla 2).

## **7.2.- Diferenciación hacia el linaje endodérmico.**

**7.2.1.- Diferenciación Hepato-Pancreática:** Cuando el cultivo alcanza el 100% de confluencia, el medio se sustituyó por el medio de inducción hepática que se compone por un medio basal para el mantenimiento de hepatocitos complementado con ácido ascórbico, hidrocortisona, transferrina, insulina y h-EGF (*Hepatocyte Bullet Kit*, Lonza). El medio de inducción se complementó con 20 ng/mL de factor de crecimiento de fibroblastos-4 (FGF-4, Sigma), 40 ng/mL de factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, Sigma), 20 ng/mL de factor de células madre (SCF, Sigma) y 20 ng/mL de FGF-básico. El cultivo se mantuvo bajo estas condiciones de catorce a treinta días, siendo reemplazado por medio fresco cada dos o tres días hasta que se observó la aparición de hepatoesferas. La naturaleza de estas hepatoesferas se evaluó para el linaje hepático y pancreático mediante inmunofluorescencia (Tabla 2) (BioE, Inc. Methods for directed differentiation of MLPC).

**7.2.2.- Diferenciación Pulmonar:** Para este ensayo de diferenciación, las células se crecieron hasta un 100% de confluencia. Posteriormente, la diferenciación pulmonar se llevó a cabo incubando las células durante tres días con el *Small airway Bullet Kit* (Lonza) que contiene un medio basal, extracto de pituitaria bovina, hidrocortisona, h-EGF, epinefrina, insulina, triiodotironina, transferrina, gentamicina/anfotericina B, ácido retinoico y albúmina de suero bovino libre de ácidos grasos. El grado de



diferenciación alcanzado se evaluó posteriormente mediante inmunocitoquímica (Tabla 2).

### **7.3.- Diferenciación hacia el linaje ectodérmico.**

**7.3.1.- Diferenciación Neural:** Para este ensayo de diferenciación se sembraron las células en el medio de cultivo habitual a una densidad de  $2,29 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en placas multipocillos recubiertas con Poli-D-Lisina (Nunc) y se cultivaron durante 24 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. La diferenciación neural se llevó a cabo según el protocolo descrito por Igura y col, 2005. La diferenciación neural se realizó en DMEM/F12 (1:1) (Gibco) complementado con suplemento B27 (Gibco), 100 mM de hidroxianisol butilado (BHA, Sigma), 0,5 mM de 3-Isobutil-1-metilxantina (IBMX, Sigma), 1mM de N6,2'-O-Dibutiriladenosina 3',5'- monofosfato cíclico sal sódica monohidrato (AMPc, Sigma), 1,5% de Dimetil sulfóxido (DMSO, Cryoserv, Bioniche Pharma) y 20 ng/mL de FGF-básico (Sigma). Las células se mantuvieron bajo estas condiciones 24 horas. Las células se lavaron, se fijaron con 4% de paraformaldehído y la diferenciación se evaluó mediante inmunocitoquímica para los marcadores específicos de las células del sistema nervioso  $\beta$ III-tubulina y neurofilamento 200 (Tabla 2).

### **8.- Tinciones:**

**8.1.- Tinción con Oil Red:** La diferenciación adipogénica se evaluó mediante la tinción de las vesículas lipídicas con Oil Red O (Sigma). Las células se lavaron con PBS 1X y se fijaron con 10% de formalina (Sigma) en PBS 1X durante treinta minutos. Tras la fijación las células se lavaron con agua destilada y se trataron durante tres minutos con Isopropanol al 60%. Se realizó en ese momento la tinción con la solución de Oil Red O (0,3% (p/v) en isopropanol) durante cinco minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se lavaron con agua destilada varias veces y la presencia de vacuolas lipídicas se evaluó mediante visualización de las muestras en un microscopio Leica DMIL con contraste de fases.

**8.2.- Tinción con Alizarín Red:** Para determinar la presencia de depósitos de calcio, las células se fijaron con 4% de paraformaldehído (Sigma) en PBS 1X, pH = 7,4 durante noventa minutos. Posteriormente, se lavaron con 1% de albúmina de suero bovino en

solución salina Hank's (Lonza) y se tiñeron con 0,1% de Alizarin Red S (Sigma) en agua destilada a pH 4,1-4,3 durante veinte minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron con 1% de albúmina de suero bovino en solución salina Hank's y la tinción se evaluó con un microscopio de contraste de fases.

**8.3.- Tinción de fosfatasa alcalina:** La actividad fosfatasa alcalina se evaluó mediante la tinción con SIGMA FAST BCIP®/NBT (5-bromo-4-cloro-3-indolyl fosfato/ azul de nitrotetrazolium). Cada tableta se diluyó en 10 mL de agua destilada generando un producto listo para su uso. Las células se fijaron en 4% de paraformaldehído durante noventa minutos, se lavaron con agua destilada y se tiñeron con la disolución SIGMA FAST durante diez minutos a temperatura ambiente. Por último, la tinción se visualizó en el microscopio de contraste de fases con cuidado de mantener siempre las muestras húmedas (Miltenyi Biotec. Methods book for nonhematopoietic (NH) stem cell media).

**8.4.- Inmunofluorescencia:** Algunas de las diferenciaciones llevadas a cabo fueron evaluadas mediante la técnica de inmunofluorescencia. El protocolo utilizado sigue un procedimiento que es común para todos los casos, siendo la única diferencia la concentración de anticuerpos utilizada para cada tinción. A continuación, se describe de forma general el procedimiento y se adjunta una tabla con los anticuerpos y las concentraciones utilizados en cada caso particular. Tras retirar el medio de cultivo las células se lavaron con PBS 1X y se fijaron con 10% de formalina (Sigma) en PBS 1X durante diez minutos a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron dos o tres veces con PBS 1X, se permeabilizaron con 0,5% de Tween-20 en PBS 1X (PBT) durante 10 minutos y se incubaron durante dos horas en solución de bloqueo (5% de suero de caballo (Lonza) disuelto en PBS 1X). Una vez finalizado el bloqueo, las células se incubaron con los anticuerpos primarios durante toda la noche en una cámara húmeda a 4° C. Las diluciones utilizadas para cada anticuerpo se detallan en la tabla 2.

A continuación, el anticuerpo primario se retiró, las células se lavaron tres veces en PBS 1X durante cinco minutos y se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados a un fluorocromo (Jackson Immunoresearch) a una concentración 1:200 durante una hora. Las células se lavaron tres veces con PBS 1X durante cinco minutos y los núcleos se tiñeron con 0,2 µg/mL de DAPI durante un minuto. Finalmente las células se visualizaron mediante microscopía de fluorescencia en un microscopio Leica DMIL.

Diferenciación	Anticuerpo	Concentración	Casa comercial
Hepato-pancreática	Anti Insulina	1:1000	Sigma
	Anti HGF receptor*	15 µg/mL	Sigma
	Anti $\alpha$ -fetoproteína	1:200	Sigma
	Anti Albúmina	1:200	Sigma
Pulmonar	Anti Surfactante B	1:100	Millipore
	Anti Prosurfactante C	1:100	Millipore
Miogénica	Anti Alfa actinina	1:600	Sigma
	Anti SK-Miosina	1:100	Sigma
Condrogénica	Anti Agrecan*	1:400	Millipore
	Anti Condroitin Sulfato*	1:150	Millipore
Cardiaca	Anti Péptido Atrial Natriurético alfa (ANP)	1:400	Millipore
Neural**	Anti $\beta$ III tubulina	1:30	Sigma
	Anti Neurofilamento 160/200	1:1000	Sigma

**Tabla 2.- Concentraciones de anticuerpos primarios utilizadas en inmunofluorescencia.** Todos los anticuerpos se diluyeron en solución de bloqueo. \* Tinción de superficie que no necesita tratamiento de permeabilización. \*\* Las células se fijaron con 4% de Paraformaldehído (Sigma) durante diez minutos a temperatura ambiente y se permeabilizaron con 0,3% de tritón X100 durante diez minutos a temperatura ambiente.

**8.5.- Tinción con Ácido Periódico Schiff (PAS):** La acumulación de glicógeno en las células sometidas al procedimiento de diferenciación hepato-pancreática se evaluó mediante la tinción de ácido periódico Schiff (Sigma). Después de que las células se lavaron una vez con PBS y que se fijaron en formalina-etanol (3,7% de formalina diluida en etanol 95%) durante un minuto a temperatura ambiente, las células se lavaron con agua del grifo durante un minuto y se tiñeron durante cinco minutos a temperatura ambiente con la solución de ácido periódico. A continuación, las células se lavaron con agua destilada varias veces y tiñeron con el reactivo de Schiff durante quince minutos,

también a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron con agua del grifo durante cinco minutos y se realizó una tinción de contraste con hematoxilina durante noventa segundos. Por último las células se lavaron con agua para eliminar el exceso de tinte. La tinción se visualizó mediante microscopía de campo claro en un microscopio Leica DMIL.

**9.- Cultivo de fibroblastos:** Como control negativo de la diferenciación de las células de la placenta se utilizaron fibroblastos adultos de piel humana (Lonza). Las células se descongelaron siguiendo el protocolo descrito para las células obtenidas del saco amniótico de la placenta humana (apartado 13), con la única modificación de que en este caso se realizó un solo lavado en medio de cultivo de fibroblastos. Las células se sembraron en placas multipocillo a una densidad de  $3,5 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> y se cultivaron en Medio Esencial Dulbecco Modificado (DMEM, Lonza), que contiene 2 mM de glutamina, 1 mM de piruvato sódico, 10% de suero bovino fetal (Lonza), 1% de antibióticos (Penicilina-Estreptomicina 10.000 Unidades, Lonza) y 25 µg/mL de Anfotericina B y se mantuvieron en un incubador a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo se reemplazó de forma parcial cada cuatro o cinco días y una vez las células alcanzaron el 80-90% de confluencia, se subcultivaron, siguiendo la misma técnica utilizada para las células obtenidas de la placenta humana. El estudio de la capacidad de diferenciación de los fibroblastos de piel humana se realizó siguiendo los mismos protocolos descritos para las células de la placenta en el apartado 7.

## **10.- Transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa.**

**10.1.- Purificación de ácido ribonucleico (ARN):** El proceso purificación de ARN a partir de las células obtenidas de la placenta y de las distintas diferenciaciones se realizó con el kit de aislamiento de ARN *AquaPure* (Bio-Rad) o con el kit de purificación de ARN *MasterPure<sup>TM</sup>* (Ecogen). Los protocolos que se describen a continuación están diseñados para procesar como máximo un millón de células y se llevaron a cabo a temperatura ambiente, a no ser que se indique lo contrario. Para la obtención de ARN se han procesado muestras tanto congeladas a -80°C como muestras frescas una vez lavadas la células dos o tres veces con PBS 1X.

**10.1.1.- Purificación de ARN con AquaPure:** Las células se lisaron con 300 µL de Solución de lisis (*RNA Lysis Solution*) y con ayuda de un raspador de plástico (Corning Life Sciences). El producto de la lisis se recoge con la pipeta en tubos eppendorf de 1,5 mL. El ADN genómico y las proteínas se precipitaron con 100 µL del tampón de precipitación (*Protein/DNA Precipitation Solution*). Los tubos se invirtieron cuidadosamente unas 10 veces para homogeneizar la muestra y se centrifugaron dos veces a 16.000 xg durante tres minutos cada una. El sobrenadante resultante de estas centrifugaciones se recogió sobre 300 µL de Isopropanol (Sigma) y los tubos se invirtieron cuidadosamente para obtener una mezcla homogénea que se centrifugó durante tres minutos a 16.000 xg. Tras descartar el sobrenadante, el ARN precipitado se lavó con 300 µL de etanol al 70%, se centrifugó a 16.000 xg durante un minuto y se dejó secar al aire durante aproximadamente treinta minutos. El ARN se resuspendió con 50 µL de solución de hidratación (*RNA Hydration Solution*) por muestra y se incubó durante treinta minutos en hielo para que se produzca la hidratación. El ARN se procesó inmediatamente o se almacenó hasta -80°C hasta su uso.

**10.1.2.- Purificación de ARN con MasterPure™:** La lisis celular se llevó a cabo con 1 µL de Proteinasa K 50 µg/µL en 300 µL de tampón de lisis para células y tejidos (*Tissue and Cell Lysis solution*) por cada pocillo y con ayuda de un raspador de plástico (Corning Life Sciences). La suspensión celular se recogió en tubos eppendorf de 1,5 mL y se incubó a 65°C durante quince minutos agitando la muestra cada 5 minutos con la ayuda de un vortex (Scientific Industries) y posteriormente, en hielo durante cinco minutos más. A continuación se añadió a la muestra 40 Unidades del inhibidor de ARNasa (*ScriptGuard™ RNase Inhibitor*) y se incubó durante treinta minutos a 37°C. Las proteínas se precipitaron con 150 µL del tampón de precipitación de proteínas (*MPC Protein Precipitation Reagent*) y se agitó fuertemente la mezcla durante 10 segundos con ayuda de un vortex, hasta que se completó la homogenización. La mezcla se centrifugó seguidamente a 13.000 revoluciones por minuto (rpm) durante diez minutos y se le añadió 25 µL del tampón de precipitación de proteínas. La muestra se centrifugó de nuevo a 13.000 rpm durante diez minutos y el sobrenadante resultante se transfirió a un tubo limpio de 1,5 mL. Los ácidos nucleicos se precipitaron con 500 µL de Isopropanol. La mezcla se invirtió unas 30 ó 40 veces para que quede perfectamente homogénea y se procedió a una nueva centrifugación durante diez minutos a 13.000 rpm

a 4°C. Este sedimento obtenido se lavó con 75% de etanol dos veces y se secó durante 10 minutos. Finalmente, el ácido nucleico se resuspendió en 35 µL de tampón TE (Tris-HCl 10 mM, pH=7,5 y EDTA 1mM) y se procesó inmediatamente o se almacenó hasta su uso a -80°C.

La cantidad de ARN obtenido, así como su posible contaminación con proteínas y/o sales se determinó mediante su medición en un espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop, Thermo Scientific). La calidad del ARN se determinó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% (Sigma) en tampón Tris/Ácido Acético/EDTA (TAE, Bio-Rad) 1X. Como patrón de peso de molecular se utilizaron los marcadores preteñidos *EZ Load<sup>TM</sup> Molecular Rulers* (Bio-Rad). Los geles de agarosa se tiñeron con SYBR® Gold (Molecular Probes) y se visualizaron con un transiluminador ChemiDoc XRS equipado con el programa informático Quantity One 1D (Bio-Rad).

**10.2.- Síntesis de ADN codificante (ADNc):** La síntesis del ADNc se realizó mediante la técnica de transcripción inversa (reversa) a partir del ARN purificado. De 0,3 a 1 µg de ARN se combinaron con 8 µmoles de oligonucleótidos genéricos (Gene Link) en un volumen final de 5 µL. Esta mezcla se sometió a desnaturalización a 70°C durante cinco minutos en bloque térmico (Selecta), incubación en hielo durante cinco minutos más y centrifugación de diez segundos en una minifuga (Harmony). La mezcla de reacción se preparó para un volumen final de 20 µL conteniendo Tampón de reacción ImProm-II<sup>TM</sup> 1X (Promega), 3 mM de cloruro de magnesio (Promega), 0,5 mM de desoxi-nucleótidos trifosfato (dNTPs, Roche), 20 Unidades de inhibidor de ARNasa (*RNasin<sup>®</sup> plus*, Promega) y cinco unidades de transcriptasa inversa ImProm-II<sup>TM</sup> (Promega). A continuación, el ciclo termal se realizó en un termociclador automático TC3000 (Techne) dotado de un sistema de tapa calefactora. El primer paso del anillamiento del ARN con los oligonucleótidos se realizó durante cinco minutos a 25°C; el segundo paso de elongación se realizó durante una hora a 45°C y finalmente se realizó la inhibición de la transcriptasa inversa durante 15 minutos a 72°C.

**10.3.- Análisis de la expresión génica mediante la reacción en cadena de la polimerasa:** Para el estudio del grado de diferenciación de las células obtenidas de la placenta se analizó la expresión de una serie de genes específicos de cada tipo de tejido que se describen en la tabla 3. La mezcla de reacción se preparó para un volumen final de 25  $\mu$ L conteniendo Tampón de reacción 1X (MBL), 1,5 mM de cloruro de magnesio (MBL), 80  $\mu$ M de desoxi-nucleótidos trifosfato (Roche), 0,3  $\mu$ M de cada oligonucleótido, 1,25 Unidades de MBL-Taq polimerasa (MBL) y 1  $\mu$ L de ADNc. Posteriormente, el ciclo termal se realizó en un termociclador automático TC3000 (Techne) dotado de un sistema de tapa calefactora y que consiste en una desnaturalización inicial de cuatro minutos a 94°C, seguida por treinta ciclos compuestos por una fase de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, una fase de anillamiento durante 30 segundos a la Temperatura de Melting de cada par de oligonucleótidos (véase tabla 3) y una fase final de elongación a 72°C durante 30 segundos. Finalmente, se realizó una elongación adicional a 72°C durante 10 minutos. Los fragmentos amplificados se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% en tampón Tris/Ácido Acético/EDTA 1X. Como patrón de peso de molecular se utilizaron los marcadores *AmpliSize<sup>TM</sup> Molecular Ruler* (Bio-Rad). Los geles se tiñeron con SYBR® Gold y se visualizaron en un transiluminador ChemiDoc XRS equipado con el programa informático Quantity One 1D (Bio-Rad).

**10.4.- Densitometría de bandas:** Este procedimiento se utiliza con el fin de realizar un análisis semicuantitativo de las bandas obtenidas en gel de agarosa. Para ello se utiliza el programa informático de procesamiento de imagen ImageJ 1.40g desarrollado por el Los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (The National Institutes of Health, USA), mediante el cual se mide la intensidad relativa de las bandas obtenidas en un gel de agarosa. Este análisis se basa en la existencia de una correspondencia entre la densidad óptica de la imagen y la intensidad o luminosidad de un píxel en la misma y permite asignar un valor de área a una determinada banda, permitiendo así compararla con otra de igual o diferente intensidad.

Marcador	Tm (°C)	Tamaño (pb)	Oligo Líder (5'→3')	Oligo Antisentido (5'→3')
<b>Control</b>				
β2-Microglobulina	58,3	301	tgactttgtcacagcccaag	tctctgctccccacctctaa
GAPDH	57,3	512	gagtaacggatttggtcgt	tgtggtcatgagtcctcca
<b>Plasticidad</b>				
Oct-4	59,4	208	gagaaggagaagctggagca	agctaagctgcagagcctca
Rex-1	57,3	403	ggaggaatacctggcattga	ttaggatgtgggcttcagg
GATA-4	58,3	576	tcctcttcctcctcaaat	tgggttaagtcccctgtag
<b>CMH</b>				
CMH ABC (I)	60,4	345	gcggctactacaaccagagc	gtggcctcatggtcagagat
CMH DR (II)	58,3	220	agacaagttcacccaccag	agcatcaaaactccagtgct
<b>Hígado</b>				
Albúmina	58,3	272	ctcaagtgtgccagtctcca	tgggattttccaacagagg
<b>Páncreas</b>				
Insulina	58,3	246	agcctttgtgaaccaacacc	agctggtagaggagcagat
<b>Pulmón</b>				
GATA-6	57,3	259	actaaccacaggcaggttg	ggtacaaaacggctccaaa
Surfactante B	58,3	244	gtccagctgcaaggaaaag	agaggatggaagtgggctct
<b>Músculo</b>				
Miogenina	59	429	cctacagatgccacaacct	gaggccgcgttatgataaaa
<b>Corazón</b>				
ANP	62,7	208	tgaagataacagccaggaggaca	agaggcgaggagtcaccatcaa
NKx2.5	57,3	302	acgcccttctcagtaaaaga	ttttcggctctagggtcctt
<b>Hueso</b>				
Osteocalcina	59,4	175	gtgcagagtcagcaaaagt	tcagccaactcgtcacagtc
Osteonectina	58,3	490	cacgatgtgtcaaggatgg	gggagggtgaagaaaaggag
<b>Cartílago</b>				
Colágeno II	59,4	426	ggctcccagaacatcaccta	tctgcccagttcaggtctct
Sox 9	57,3	244	ttgagccttaaaacgggtgct	ctggtgttctgagaggcaca
<b>Grasa</b>				
AP4	57,3	181	tactgggccaggaatttgac	gtggaagtgcgccttcat
PPARγ2	57,3	586	tgcagtggggatgtctcata	gggctccataaagtcaccaa
<b>Neural</b>				
β III tubulina	59,4	367	acctcaaccacctggatcg	gggatccactccagaagta
Neurofilamento 200	56,3	233	aggaaccagatgatgccaag	tggaggcttgcgtctttt

**Tabla 3.- Relación de oligonucleótidos utilizados para el análisis molecular mediante PCR del ADN codificante.** Los oligonucleótidos se han diseñado con la herramienta informática Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>), a excepción de los oligonucleótidos para la proteína atrial natriurética que se han diseñado utilizando la herramienta informática IDT SciTools PrimerQuest<sup>SM</sup> (<http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/PrimerQuest/>). Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Bonsai Technologies.



**11.- Análisis del cariotipo.** El análisis del cariotipo de las células obtenidas de la placenta se realizó en células correspondientes a los últimos pases del cultivo en el departamento de genética del Hospital Universitario 12 de Octubre. Las células se trataron con 10 µg/mL de Colcemida durante dos horas a 37°C para incrementar el número de metafases y se aislaron de la placa de cultivo mediante digestión con tripsina-Versene y centrifugación a 225 xg durante diez minutos. Posteriormente, se resuspendieron en 500 µL de medio de cultivo y se sometieron a un choque hipotónico con 0,075 M de cloruro de potasio (Sigma). Las células se fijaron con 10 mL de fijador de Carnoy fresco (metanol: ácido acético, 3:1) durante treinta minutos, se centrifugaron durante cinco minutos a 200 xg, se lavaron dos veces con 10 mL de fijador fresco y se resuspendieron en 100 µL de fijador. A continuación, se realizó la extensión de la muestra en un portaobjetos y se procedió, posteriormente, a la tinción de bandas G. Para ello, las muestras se incubaron durante toda la noche a 50°C y a temperatura ambiente durante al menos treinta minutos. Posteriormente, las muestras se pretrataron con tripsina-Versene durante 25 segundos y con una solución salina Hank's que contiene 2% de suero bovino fetal para inactivar la acción de la tripsina. Después, las células se lavaron en agua destilada y se tiñeron con la solución de tinción de Giemsa durante cinco minutos. A continuación, la muestra se lavó con tampón fosfato de Gurr (Invitrogen) y agua destilada durante unos segundos. Finalmente, la muestra se montó en medio de montaje Cytoseal 60 (Thermo Scientific) y se evaluó mediante microscopía de campo claro. Al menos veinte metafases en cada muestra se fotografiaron y analizaron con el programa informático Ikaros (Ikaros Karyotyping software, MetaSystems).

**12.- Determinación de la actividad telomerasa:** Este estudio se realizó con el Kit de detección de Telomerasa *TARPeze®* (Millipore) y de acuerdo con las instrucciones indicadas en dicho kit. La actividad telomerasa se determinó en cinco extractos celulares pertenecientes a diferentes pases (pase 1, 5, 10, 13 y 16) de un mismo cultivo. Esta actividad se determinó en células procedentes de tres placentas diferentes. El extracto celular se obtuvo mediante lisis de las células con 200 µL del tampón de lisis CHAPS 1X complementado con 200 unidades/mL de inhibidor de RNasa (*RNAasin® plus*, Promega). Este proceso se realizó en hielo. Las células se retiraron del pocillo con un raspador celular (Corning Life Sciences) y se homogeneizaron con la pipeta.

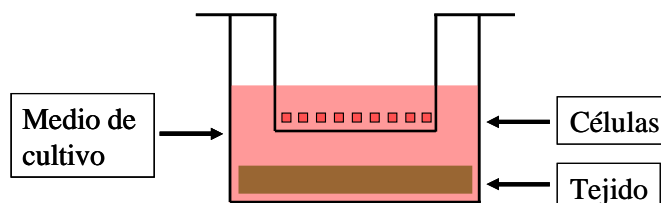
Posteriormente, la suspensión se incubó en hielo durante 30 minutos y se centrifugó a 12.000 xg durante veinte minutos a 4°C. El sedimento se descartó y la concentración de proteínas se valoró en una pequeña alícuota del sobrenadante mediante la técnica de Lowry con el kit *DC Protein Assay* (Bio-Rad). La medida espectrofotométrica de las muestras se realizó a una longitud de onda de 750 nm en un espectrofotómetro SmartSpec Plus (Bio-Rad). El resto del sobrenadante se conserva a -80°C hasta su utilización. Como control positivo se utilizó un extracto de células con elevada actividad telomerasa contenidas en el kit resuspendidas en 200 µL de tampón de lisis CHAPS 1X.

Para la determinación de la actividad telomerasa se utilizaron 1,5 µg de proteína por ensayo en un volumen final de 10 µL. Para cada extracto se prepararon dos muestras, una que corresponde al extracto nativo y otra que se utiliza como control negativo que se inactivó por calor durante 15 minutos a 100°C. Tanto los controles negativo y positivo, como la mezcla de reacción se prepararon de acuerdo con las instrucciones del kit *TARPeze®*. A continuación se procedió a la amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa acoplada a la actividad telomerasa. Para ello se realizó un ciclo termal compuesto por tres etapas. En la primera se realizó la adición de repeticiones teloméricas mediante una incubación a 30°C durante treinta minutos. La segunda fase consistió en la inactivación de la enzima telomerasa mediante una incubación de dos minutos a 92°C. Las repeticiones teloméricas se amplificaron a continuación mediante la reacción en cadena de la polimerasa que consiste en una desnaturalización inicial de dos minutos a 92°C, seguida por 33 ciclos de 94°C durante treinta segundos, 59°C durante treinta segundos y 72°C durante un minuto. El procedimiento se llevó a cabo en un termociclador automático TC3000 dotado de un sistema de tapa calefactora. Finalmente, las repeticiones teloméricas se analizaron mediante electroforesis vertical en gel no desnaturalizante compuesto por 12,5% de acrilamida/bisacrilamida (Bio-Rad) en Tampón Tris/Borato/EDTA 0,5X (TBE, 0,5M de Tris/ 0,5M de Ácido Bórico/ 10mM de EDTA, Sigma). La electroforesis se llevó a cabo en un sistema Criterion™ Cell (Bio-Rad). Los geles se tiñeron posteriormente con SYBR® Gold (Molecular Probes) y se visualizaron en un transiluminador ChemiDoc XRS equipado con el programa informático Quantity One 1D (Bio-Rad).

**13.- Criopreservación:** En pases tempranos del cultivo se realizó la criopreservación de las células obtenidas del saco amniótico. Una vez alcanzado aproximadamente el 50% de confluencia las células se recogieron de la placa de cultivo mediante digestión con tripsina-Versene y se contaron en una cámara de Neubauer. Las células se resuspendieron a una concentración de  $5 \times 10^5$  células por cada 500  $\mu\text{L}$  de medio de congelación (*Cell Culture Freezing Medium-DMSO*, Millipore) en criotubos de 2 mL (Nunc). Los criotubos se almacenaron en un baño controlado de Isopropanol (*Mr Frosty* Cryo 1°C Freezing Container, Nalgene) a  $-80^\circ\text{C}$  durante al menos cuatro horas y posteriormente se transfirieron a un tanque de nitrógeno líquido para su almacenamiento a largo plazo.

Para la descongelación de las células, los criotubos se sumergieron rápidamente en un baño a  $37^\circ\text{C}$ . Posteriormente, las células se lavaron dos veces con 10 mL de medio de cultivo y se centrifugaron a 400 xg durante 10 minutos. Las células se resuspendieron en medio de cultivo completo y se sembraron en un pocillo de una placa multipocillo p6.

**14.- Cocultivo de las células derivadas de la decidua con tejido:** Con el fin de simular un microambiente tisular y conocer el comportamiento de las células derivadas de la decidua frente a una lesión tisular, se cultivaron las células en presencia de hígado tanto sano como lesionado en un sistema de cámaras de cultivo denominadas *“Transwell”* (Corning Costar). Como se muestra en la figura 9, este sistema genera dos secciones independientes, separadas por una membrana permeable de policarbonato que posee un diámetro de poro de  $0,4 \mu\text{m}$ . Este sistema de cultivo permite la libre circulación de factores solubles y aire entre el compartimento inferior y superior y además evita que las células y el tejido entren en contacto directo.



**Figura 9.- Representación esquemática de la cámara de cultivo o transwell.**

El tejido hepático sano y lesionado se obtuvo de ratones Balb/c sanos. Para la obtención del tejido hepático lesionado, los ratones se sometieron a un tratamiento hepatotóxico mediante una inyección intraperitoneal de 10  $\mu$ L por gramo de peso del animal de una solución de 10% de tetracloruro de carbono (Sigma) diluido en aceite mineral (Jang y col., 2004). Los ratones se sacrificaron con anestésico Isoforane a las 48 horas de iniciado el tratamiento. A continuación, se extrajo el hígado sano y lesionado, se pesó, se troceó finamente y se homogeneizó con un homogeneizador manual de vidrio tipo Dounce en 4 mL de medio de mantenimiento de los cocultivos que se compone por Medio Esencial Dulbecco Modificado (DMEM, Lonza) que contiene 2 mM glutamina y 1 mM piruvato sódico, 1% de una solución de antibióticos (Penicilina-Estreptomicina 10.000 Unidades, Lonza), 1% de aminoácidos no esenciales (Lonza) y 55  $\mu$ M de  $\beta$ -mercaptoetanol (Sigma). Posteriormente, se añadió 1 mL del mismo medio y se almacenó a -80°C hasta su uso. Para el cocultivo, las células se sembraron en la cámara superior del *transwell* a una densidad de  $3.7 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en el medio habitual de mantenimiento de los cultivos (véase apartado 2) tanto en la parte inferior como en la superior del *transwell*. Una vez alcanzada la confluencia, el medio de cultivo habitual se sustituyó por el medio de mantenimiento del cocultivo en ambas cámaras y en la cámara inferior se añadieron 50 miligramos de hígado sano o hígado lesionado. Como control del cocultivo las células se incubaron sin tejido en la cámara inferior. El cocultivo se mantuvo en un incubador a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> durante 48 y 80 horas. A continuación, las células se lavaron dos veces con PBS 1X por ambas caras de la membrana del *transwell* para retirar los restos de medio y tejido e inmediatamente se almacenaron a -80°C hasta su uso. Por último, el ARN se extrajo y se analizó mediante las técnicas descritas en el apartado 10. Los marcadores específicos de diferenciación hepática que se analizaron fueron albúmina y  $\alpha$ -fetoproteína cuya relación de oligonucleótidos detalla en la tabla 4. La expresión de los ARN mensajeros para albúmina y  $\alpha$ -fetoproteína se evaluó de forma semicuantitativa mediante densitometría de las bandas obtenidas en los geles de agarosa como se describe en el apartado 10.4. Los valores obtenidos se normalizaron con los valores obtenidos para el gen control GAPDH.

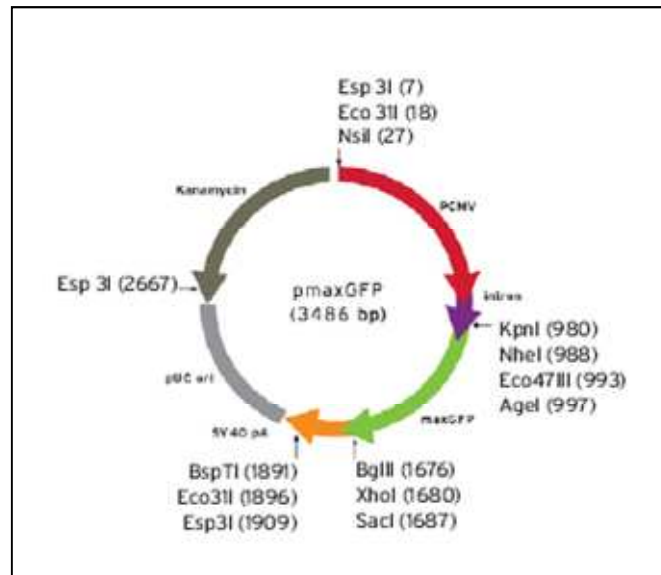
Los datos obtenidos de tres experimentos independientes se expresan como la media  $\pm$  la desviación estándar y se analizaron por triplicado. Estos datos, se compararon, finalmente, mediante el empleo del estadístico t de Student teniendo en cuenta que se

trata de muestras independientes con distinta varianza, determinando así, la significancia en las diferencias obtenidas, con una confianza del 99% ( $p < 0.01$ ).

Marcador	Tm (°C)	Tamaño (pb)	Oligo Líder (5'→3')	Oligo Antisentido (5'→3')
Albúmina	58,3	398	ctcaagtgtgccagtctcca	aacatgcccaggaagacatc
$\alpha$ -fetoproteína	58,3	366	gggagcggctgacattatta	ccctcttcagcaaagcagac
GAPDH	57,3	512	gagtcaacggatttggtcgt	tgtggtcatgagtcctcca

**Tabla 4.- Relación de oligonucleótidos utilizados para el análisis molecular del ARN obtenido de los cocultivos de la células con hígado sano y lesionado.** Los oligonucleótidos se han diseñado con la herramienta informática Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) y fueron sintetizados por Bonsai Technologies. Los oligonucleótidos utilizados no alinean con las secuencias de ADNc de ratón de los genes analizados.

**15.- Nucleofección:** Para transfectar las células se utilizó el sistema Nucleofector (Amaxa). Cuando las células alcanzaron el 85% de confluencia en el cultivo se digirieron con tripsina-Versene y se resuspendieron en la mezcla de reacción a una concentración de  $5 \times 10^5$  células en 100  $\mu$ L. La mezcla de reacción se compone de la solución *Human MSC Nucleofector Solution* más su suplemento (*Human MSC Nucleofector® Kit*, Amaxa). Posteriormente, se añadió a las células 2  $\mu$ g del vector pmaxGFP<sup>TM</sup> (Figura 10), también contenido en el *Human MSC Nucleofector® Kit* (Amaxa). Este vector codifica la proteína verde fluorescente (GFP) del copépodo *Potellina sp* que facilita el análisis por microscopía de fluorescencia o citometría de flujo de la eficiencia de nucleofección.



**Figura 10.- Vector *pmaxGFP<sup>TM</sup>* contenido en el kit *Human MSC Nucleofector® Kit*.**

Las células se transfectaron utilizando dos programas diferentes (U23 de alta eficiencia y C17 de alta supervivencia) de acuerdo a las instrucciones del aparato. Una vez finalizada la transfección, las células se resuspendieron en 500  $\mu$ L de medio de cultivo precalentado a 37°C y se sembraron en un pocillo de una placa multipocillo p6 que contenía 1 mL de medio de cultivo completo.

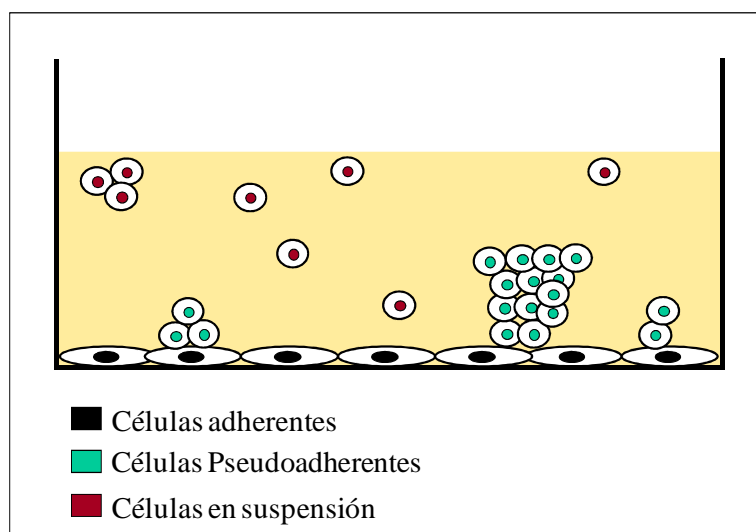
## V. RESULTADOS.



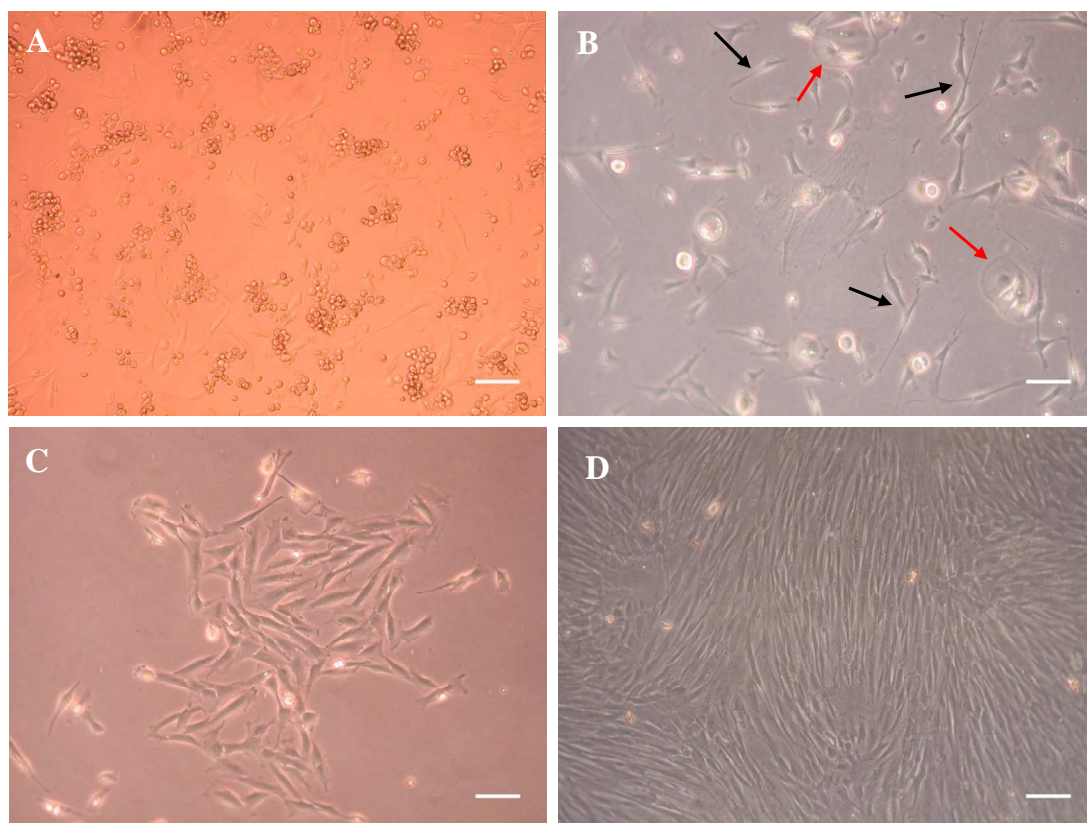


### **1.- Obtención de células del saco amniótico de la placenta humana:**

Las células madre han despertado un gran interés en biomedicina por su posible aplicación práctica en ensayos clínicos para el tratamiento de un gran número de enfermedades. A pesar de que el uso de células madre adultas no tiene los problemas éticos de las células embrionarias, el número de células madre adultas presentes en los tejidos es bajo y, en la mayoría de los casos, su obtención se realiza mediante procedimientos invasivos que implican riesgos para el donante. La placenta, a pesar de su origen mayoritariamente embrionario, se considera un tejido adulto y por lo tanto, puede representar una fuente importante de obtención de células madre adultas sin ningún tipo de riesgos para el donante al ser un tejido que se desecha después del nacimiento. En nuestro laboratorio hemos establecido un protocolo de aislamiento de células madre de las membranas extraembrionarias de la placenta humana mediante digestión enzimática. Al día siguiente a la obtención de las células ya se pueden observar en la placa de cultivo tres poblaciones celulares bien definidas y caracterizadas por su diferente capacidad de adherencia al plástico de la superficie de cultivo (Figura 11). Así, podemos observar células no adherentes, células pseudoadherentes y células adherentes (Figura 12 A). A los cinco días del inicio del cultivo, las células no adheridas y las pseudoadherentes se retiran mediante aspiración del medio, manteniéndose sólo las células adherentes al plástico (Figura 12 B).

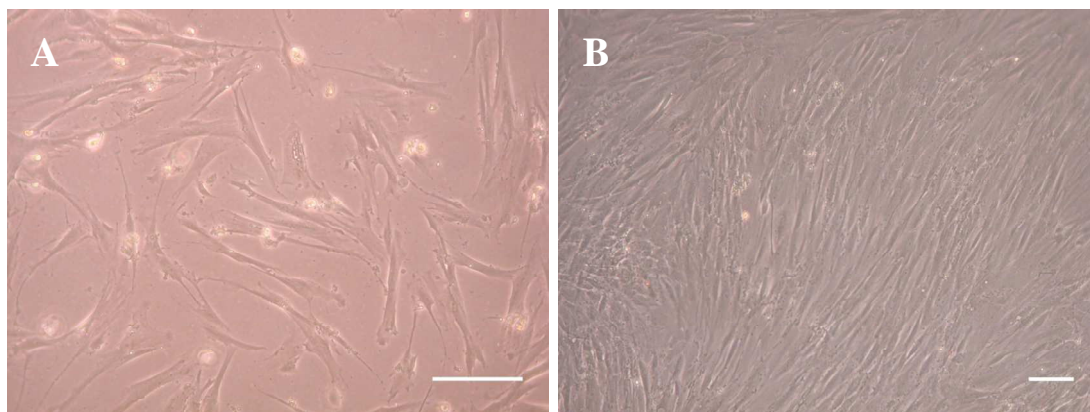


***Figura 11.- Representación esquemática de los tipos de células obtenidas 24 horas después de procesar el saco amniótico de la placenta humana.***



**Figura 12.- Poblaciones celulares obtenidas a partir del saco amniótico de la placenta humana.** (A) Aspecto del cultivo a las 24 horas de su obtención. (B) En esta imagen se pueden observar los dos tipos de células adherentes que conviven durante los primeros pases. (C) Colonia de células con morfología de fibroblasto a los once días del inicio del cultivo. (D) Células en pase tres al 100% de confluencia. La barra de escala representa 200  $\mu\text{m}$ .

En los dos primeros pases del cultivo, la población de células adherentes se caracteriza por ser una población heterogénea donde se pueden distinguir células con morfología epitelioide (Figura 12 B flechas rojas) y células con morfología de fibroblasto (Figura 12 B flechas negras). A partir del décimo día, las células con morfología de fibroblasto empiezan a formar colonias (Figura 12 C) que llenarán la placa de cultivo. Las células epiteliales van desapareciendo durante los dos primeros pases, y a partir del tercer pase, el cultivo se compone por una población homogénea de células con morfología de fibroblasto (Figura 12 D). Esta población se mantiene estable desde el punto de vista morfológico hasta el final del periodo de cultivo que se caracteriza porque las células proliferan más lentamente, se ensanchan ligeramente y se vacuolizan alcanzando la senescencia (Figura 13).

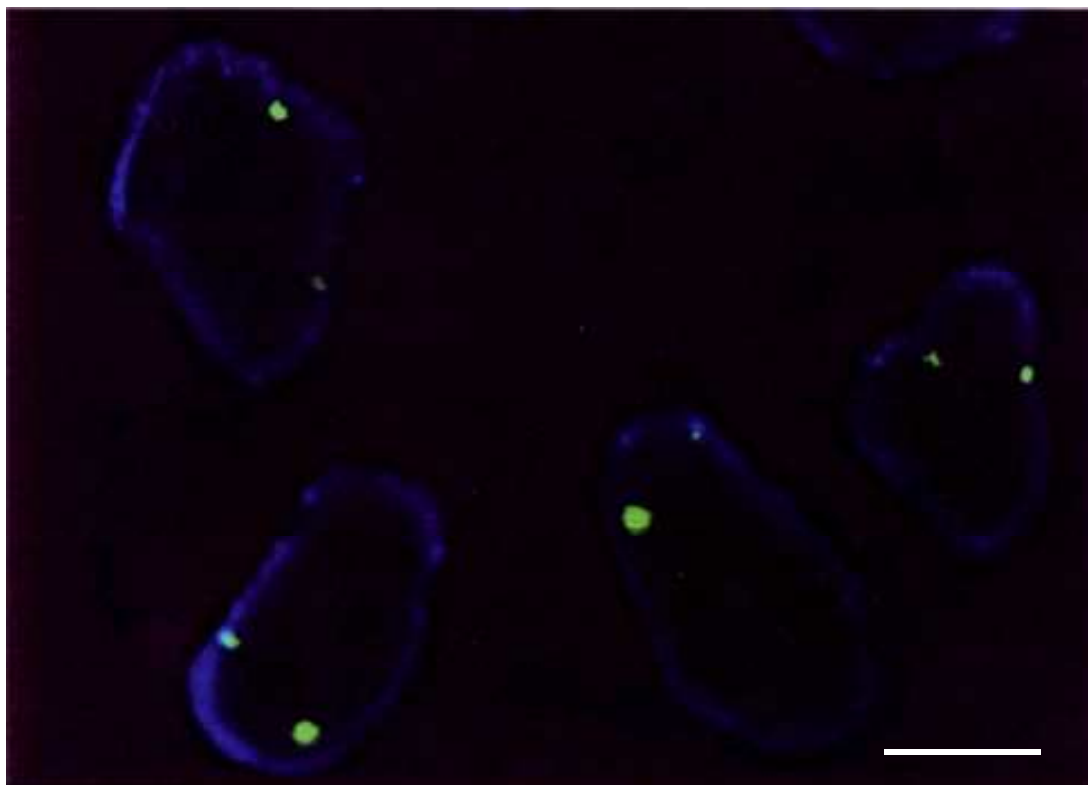


**Figura 13.- Células senescentes.** En la figura se muestran las células a distintas confluencias una vez alcanzado el final del periodo de cultivo. En este momento, las células se acortan ligeramente pero siguen manteniendo su morfología de fibroblasto inicial. La barra de escala representa 200  $\mu\text{m}$ .

El presente trabajo se ha basado en la caracterización fenotípica y en el estudio de la plasticidad de las células con morfología de fibroblasto derivadas del saco amniótico de la placenta humana.

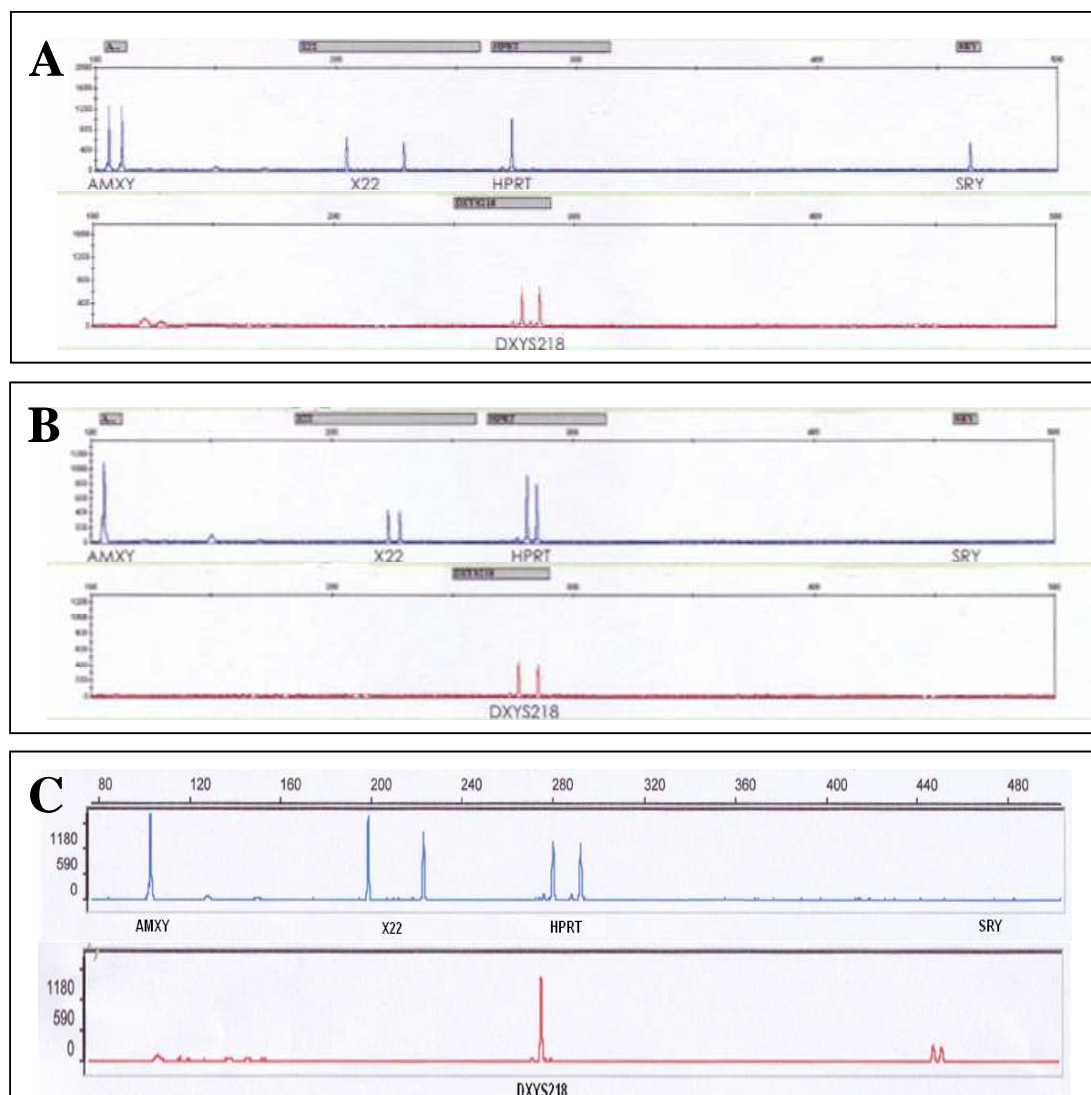
## **2.- Estudio de la procedencia de las células obtenidas del saco amniótico de la placenta humana:**

El saco amniótico de la placenta humana, está compuesto por tres membranas, la membrana amniótica y la coriónica, que derivan del mesodermo embrionario primitivo, y la decidua, una membrana de origen materno que se mantiene en íntimo contacto con la membrana coriónica. Dada la composición anatómica del saco amniótico decidimos estudiar la procedencia materna o fetal de las células adherentes que habíamos aislado. Para ello, se analizaron mediante dos técnicas diferentes, las células obtenidas de tres placentas en las que el niño nacido era varón. Por un lado, analizamos la presencia de los cromosomas sexuales X e Y mediante la técnica de hibridación *in situ* fluorescente. En todas las muestras analizadas se observó la presencia de dos cromosomas X en la totalidad de las células (Figura 14). Este resultado sugiere que las células obtenidas en nuestro laboratorio del saco amniótico de la placenta humana son de procedencia materna.



**Figura 14.- Hibridación in situ fluorescente para los cromosomas sexuales X e Y.** El cromosoma X aparece teñido en verde (FITC) y el cromosoma Y en rojo (TRITC). Tinción de la cromatina en azul, realizada con DAPI. En todas las células analizadas se observa la presencia de dos señales de cromosoma X. Barra de escala correspondiente a 10  $\mu\text{m}$ .

Paralelamente, se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa fluorescente (QF-PCR siglas de su nombre en inglés “*quantitative-fluorescence polymerase chain reaction*”). Mediante esta técnica se analizan distintas secuencias repetidas en tándem localizadas en el par cromosómico sexual humano. Las secuencias X22 y DXYS218 se utilizan como marcadores pseudoautosómicos ya que ambos presentan locus en las regiones de homología de los cromosomas sexuales y sirven como control de diploidía y heterocigosidad de las muestras analizadas. Por otro lado, el gen AMXY o amelogenina se trata de una región altamente conservada en mamíferos que presenta dos locus claramente diferenciados en el genoma humano, de tal manera que se encuentra localizado tanto en el cromosoma X como en el Y aunque fuera de la regiones de apareamiento homólogo. Finalmente, también se analizan los marcadores



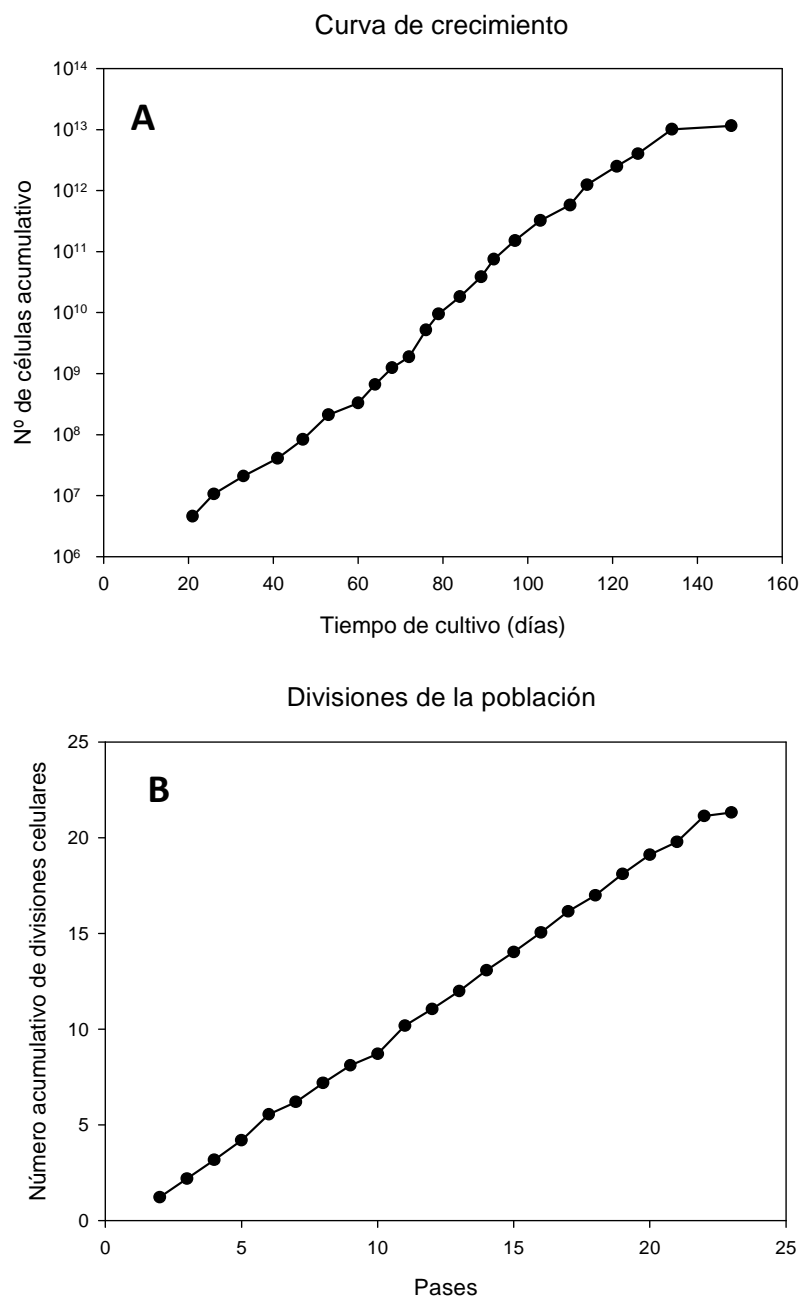
**Figura 15.- Estudio de repeticiones cortas en tandem mediante QF-PCR.** (A) Control de células epiteliales de varón. (B) Control de células epiteliales de hembra. (C) Células obtenidas del saco amniótico de la placenta humana. El patrón de expresión de los marcadores cromosómicos AMXY, X22, HPRT, SRY y DXYS218 corresponde a células de sexo femenino.

HPRT y SRY que se localizan fuera de las regiones de apareamiento homólogo del par sexual humano. El gen HPRT tiene su locus en el brazo largo del cromosoma X y la región SRY implicada en la determinación testicular, se localiza en el brazo corto del cromosoma Y. El patrón combinado de expresión de todos estos marcadores es, por tanto, inequívocamente indicativo del complemento sexual de las muestras. El análisis cromosómico de las tres muestras analizadas mostró un patrón de expresión compatible con el sexo femenino (Figura 15).

Las células obtenidas del saco amniótico se compararon con células epiteliales control de varón y hembra (Figura 15), poniéndose de manifiesto que las células obtenidas del saco amniótico de la placenta presentan un patrón de fragmentos cromosómicos similar al de las células de hembra. Un claro indicador del sexo femenino de las células del saco amniótico de la placenta es la ausencia del fragmento SRY sumada a la presencia de un único pico de expresión para el marcador AMXY y dos picos para HPRT. Estos datos, sumados a los resultados de la hibridación *in situ* fluorescente hace concluir que se trata de células de sexo femenino provenientes de la membrana materna del saco embrionario de la placenta y por tanto, de la decidua.

### **3.- Estudio de la dinámica de la población de las células obtenidas de la decidua humana:**

Como se ha mencionado en el apartado 1, las células obtenidas del saco amniótico de la placenta humana presentan una morfología tipo fibroblasto que se mantiene hasta el final del periodo de cultivo. El estudio de la dinámica de crecimiento de las células derivadas de la decidua demostró que es de tipo exponencial (Figura 16). Las células alcanzaron  $19,08 \pm 2,68$  pases en los cuales se sucedieron  $19,5 \pm 4,32$  divisiones de la población original con un tiempo de generación medio de  $96 \pm 24,72$  horas. El número medio inicial de células adherentes a confluencia fue de  $6,88 \pm 5,23 \times 10^6$  y el número medio de células alcanzado en la población final fue de  $2,54 \pm 4,97 \times 10^{14}$  en un tiempo de  $122,33 \pm 25,62$  días. Los datos se expresan como media  $\pm$  desviación estándar (n=9). Como se observa en el ejemplo presentado en la Figura 16 las células se expanden a lo largo de 23 pases generando un número final de  $1,15 \times 10^{13}$  células, siendo el tiempo aproximado de cultivo de 148 días. En este periodo de tiempo sucedieron 21,32 divisiones de la población original, con un tiempo de generación medio de 5,38 días en los pases del 2 al 22.



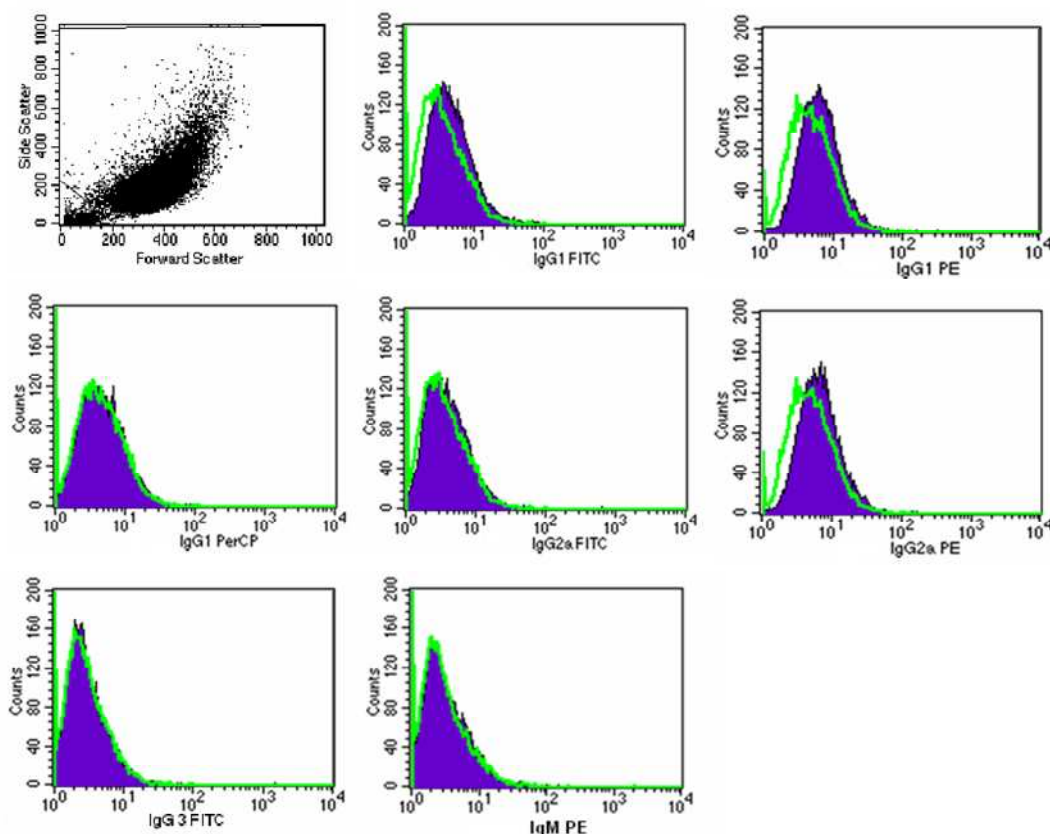
**Figura 16.- Ejemplo de las curvas de crecimiento de las células derivadas del saco amniótico.** (A) Durante un periodo de cultivo de 148 días se generó una población de  $1'15 \times 10^{13}$  células totales. (B) Durante los 23 pases del cultivo las células llevan a cabo 21'31 divisiones celulares.

#### **4.- Caracterización fenotípica y molecular de las células obtenidas de la decidua:**

**4.1.- Estudio del fenotipo mesenquimal:** La morfología de fibroblasto y su capacidad de adherencia al plástico sugieren que las células obtenidas de la decidua de la placenta humana pueden ser de tipo mesenquimal. Por ello, se ha analizado el fenotipo de las



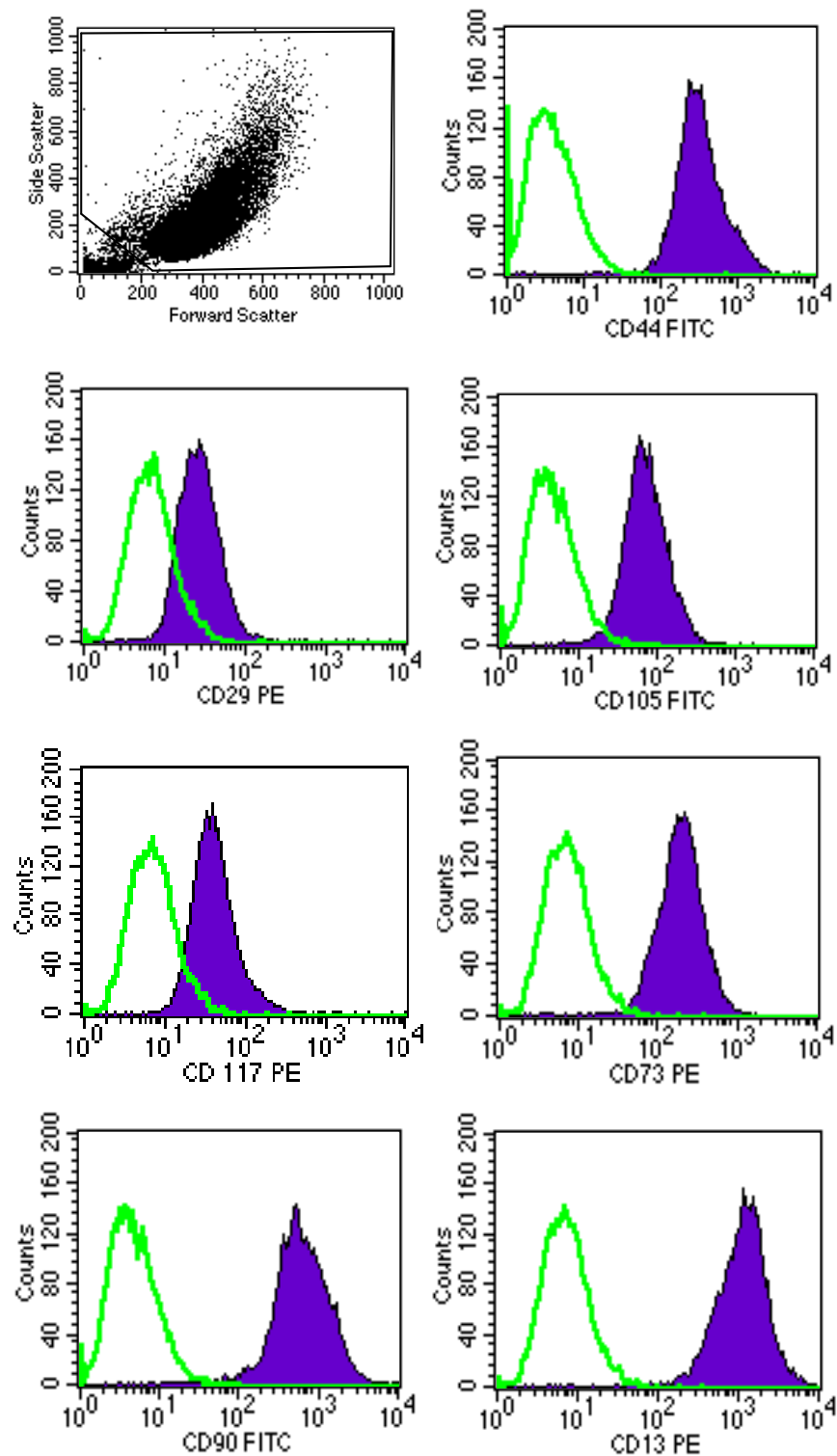
células obtenidas mediante citometría de flujo. Para calcular y corregir la unión inespecífica de cada anticuerpo se utilizó un control de isotipo conjugado con el fluorocromo correspondiente de la misma clase de inmunoglobulina y la misma concentración que el anticuerpo analizado. En la figura 17 se recogen de forma conjunta todos los isotipos analizados. Como se puede observar los anticuerpos utilizados en el análisis del fenotipo no se unen de forma inespecífica a las células derivadas de la decidua.



**Figura 17.- Control de Isotipos.** En la figura se muestran todos los isotipos analizados en cada ensayo de citometría de flujo. La línea verde representa la autofluorescencia de las células y la curva morada, la unión inespecífica de la inmunoglobulina correspondiente a cada uno de los anticuerpos utilizados en el análisis fenotípico.

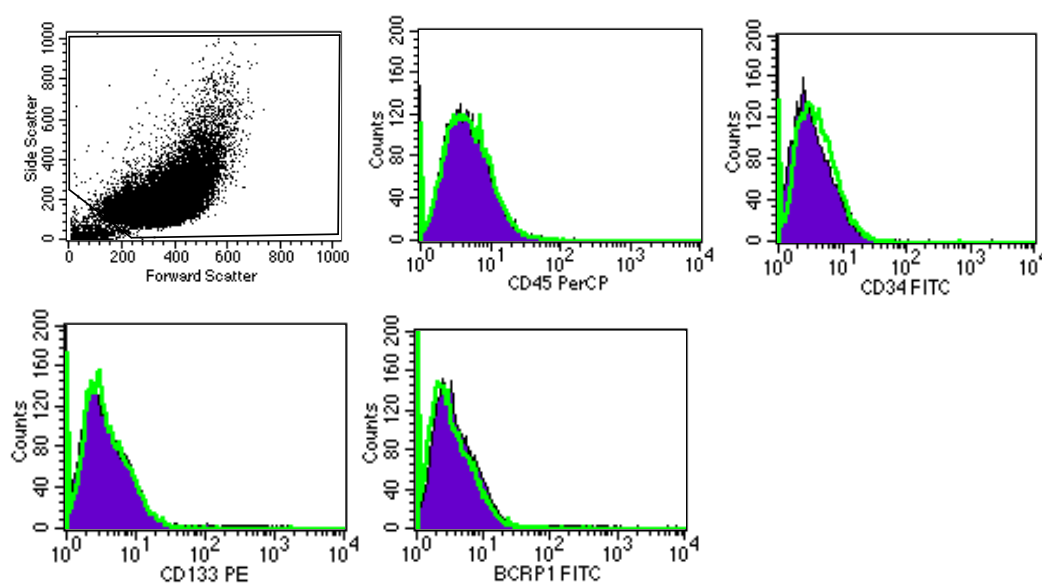
Las células madre mesenquimales más estudiadas son las células mesenquimales de la médula ósea. Las células madre mesenquimales se caracterizan por su capacidad de adherencia al plástico, la ausencia de marcadores de células madre hematopoyéticas (CD34, CD45, CD133 o BCRP1) y la expresión conjunta de marcadores característicos





**Figura 18.- Estudio de los marcadores típicos de células madre mesenquimales en las células derivadas de la decidua.** Análisis mediante citometría de flujo de los antígenos característicos de las células madre mesenquimales. Las células son claramente positivas para todos los marcadores analizados.

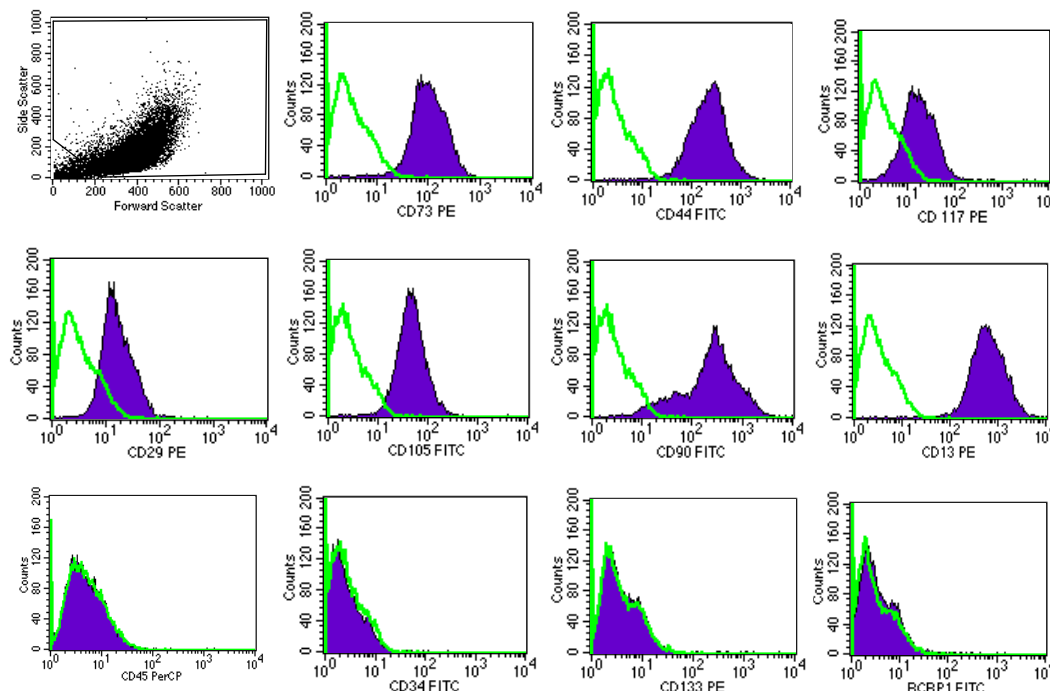
de otros tipos celulares (CD105, CD73, CD44, CD90, CD71, Stro-1, CD106, CD166 y CD29 (Minguell y col., 2001; Miao y col., 2006 y Chamberlain y col., 2007)). En el estudio del fenotipo de las células derivadas de la decidua humana se analizaron los siguientes marcadores: CD73 (SH3, SH4), CD105 (SH2), CD29 (integrina  $\beta 1$ ), CD44 (H-CAM), CD117 (c-kit), CD90 (Thy-1) y CD13 (aminopeptidasa) característicos de células mesenquimales. Además, se estudiaron los siguientes antígenos característicos de células hematopoyéticas: CD45, CD34, CD133 y BCRP1. Los resultados obtenidos muestran que las células de tipo fibroblasto obtenidas de la decidua son claramente positivas para CD73, CD90, CD13, CD44, CD105, CD117 y CD29 (Figura 18) y negativas para los marcadores de las células madre hematopoyéticas CD45, CD34, CD133 y BCRP1 (Figura 19). Estos resultados indican que las células con morfología de fibroblasto obtenidas del saco amniótico de la placenta humana son células de tipo mesenquimal.



**Figura 19.- Marcadores típicos de células madre hematopoyéticas.** Análisis mediante citometría de flujo para los marcadores característicos de las células madre hematopoyéticas. Las células derivadas de la placenta humana son negativas para estos marcadores.

Las células derivadas de la decidua humana mantienen la expresión de los antígenos característicos de las células madre mesenquimales hasta el final del cultivo. En la figura 20 se muestra el análisis mediante citometría de flujo de un cultivo de células senescentes, correspondientes a la última población obtenida. El fenotipo característico

de las células mesenquimales se mantiene estable a pesar del cambio de morfología sufrido por las células cuando alcanzan la senescencia (Figura 13).



**Figura 20.- Estudio fenotípico de las células derivadas de la placenta cuando alcanzan la senescencia.** Análisis mediante citometría de flujo de una población celular correspondiente al último pase de un cultivo. Las células al final del periodo de cultivo siguen siendo negativas para los marcadores de células hematopoyéticas (CD45, CD34, CD133 y BCRP1) y mantienen la expresión de los marcadores de las células mesenquimales CD73, CD44, CD117, CD29, CD105, CD90 y CD13.

#### 4.2.- Estudio de las características inmunológicas de las células derivadas de la

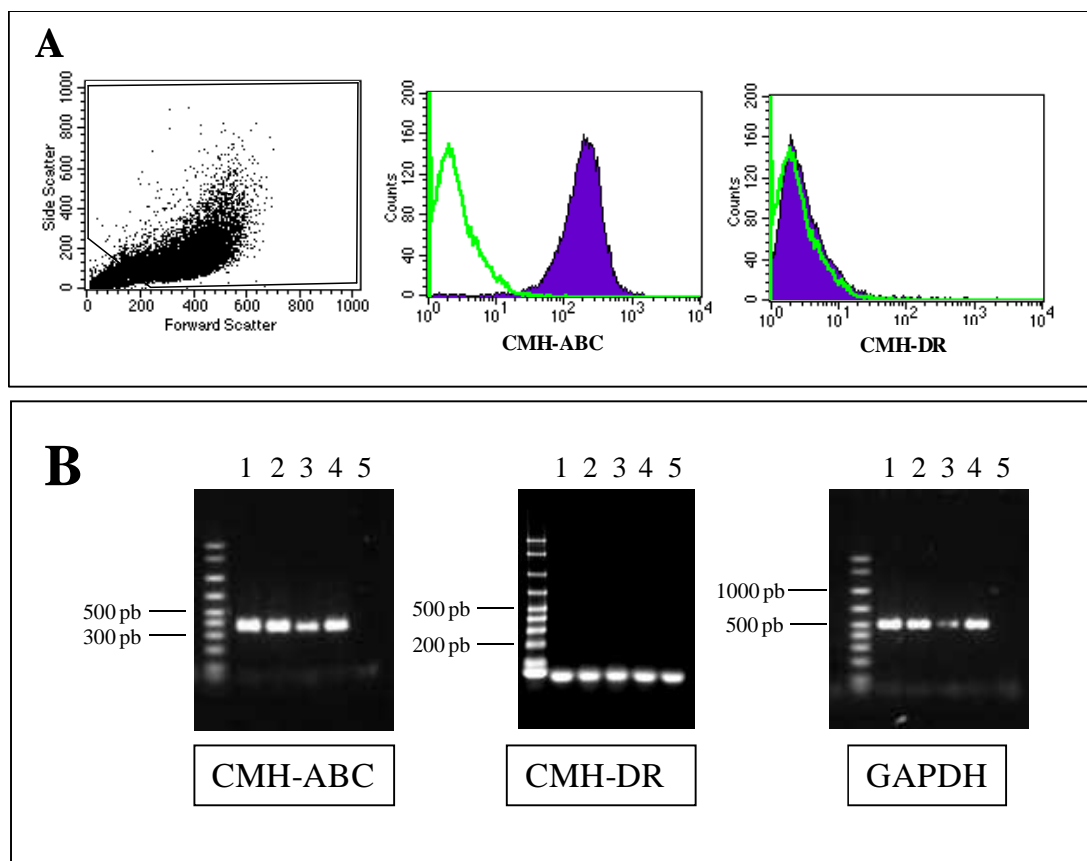
**decidua:** El principal uso de las células madre es el trasplante celular en ingeniería de tejidos y medicina regenerativa. La principal limitación de los trasplantes radica en el rechazo del injerto por parte del receptor. Este rechazo sucede, fundamentalmente, por el reconocimiento directo de los aloantígenos del donante por parte de los linfocitos T del receptor. Estos aloantígenos forman parte del complejo mayor de histocompatibilidad y se suelen denominar antígenos CMH o antígenos HLA (siglas en inglés de “*Histocompatibility Leucocyte Antigen*”) (Abbas y Lichtman, 2004). Existe además, una vía secundaria o indirecta de reconocimiento por parte de los linfocitos que es la vía de las células presentadoras de antígenos que son las encargadas de presentar los antígenos, una vez procesados en el interior celular, a los linfocitos B y T (Abbas y

Lichtman, 2004). Una célula presentadora de antígenos expresa en su superficie celular las moléculas coestimuladoras CD40, CD80 y CD86.

Las células madre mesenquimales de la médula ósea no expresan moléculas del sistema mayor de histocompatibilidad tipo II ni moléculas coestimuladoras CD40, CD80 y CD86, pero sí expresan moléculas del sistema mayor de histocompatibilidad tipo I (Chamberlain y col., 2007). La ausencia de moléculas de histocompatibilidad tipo II confiere a las células madre mesenquimales la capacidad de escapar al reconocimiento alorreactivo de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Las moléculas de histocompatibilidad tipo I podrían activar a las células T, pero la ausencia de las moléculas coestimuladoras, hace imposible la generación de una señal secundaria, dejando a las células T anérgicas. Además esta expresión de histocompatibilidad tipo I en las células mesenquimales les confiere protección sobre los linfocitos citolíticos naturales que suelen atacar a las células que presentan una desregulación en su complejo de histocompatibilidad tipo I, como, por ejemplo, algunas células tumorales (Ryan y col., 2005). Estas características inmunogénicas de las células mesenquimales indican que son unas candidatas idóneas para su uso en medicina regenerativa a través de trasplante celular pues reducen al mínimo la posibilidad del rechazo del injerto.

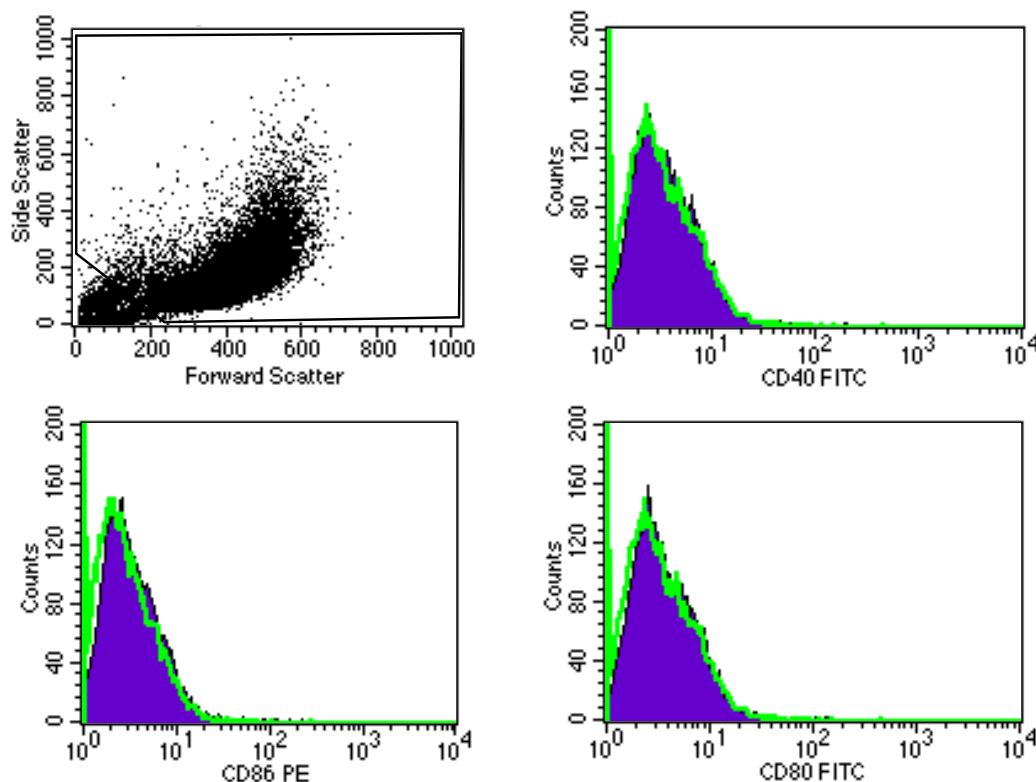
Dada la naturaleza mesenquimal de las células derivadas del saco amniótico de la placenta humana se ha realizado el estudio de las características inmunológicas de dichas células. Mediante citometría de flujo se ha observado que las células aisladas en nuestro laboratorio no expresan el sistema mayor de histocompatibilidad de clase II (CMH-DR), pero sí los marcadores de clase I (CMH-ABC) (Figura 21). La expresión de estas dos moléculas se confirmó, además, mediante el análisis del ARN purificado (Figura 21 B). Estos resultados sugieren que estas células obtenidas del saco amniótico de la placenta humana pueden presentar baja inmunogenicidad similar a la presentada por las células mesenquimales de la médula ósea.

Para completar el estudio de las características inmunológicas de las células derivadas del saco amniótico se ha analizado la expresión de tres cofactores implicados en la respuesta inmune, CD40, CD80 y CD86. Como se muestra en la figura 22 las células derivadas de la placenta son negativas para la expresión de estos tres cofactores.



**Figura 21.- Estudio de la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad.** (A) Estudio mediante citometría de flujo de los marcadores del complejo mayor de histocompatibilidad en las células obtenidas del saco amniótico de la placenta humana. Las células derivadas de la placenta expresan CMH tipo I o ABC y son negativas para el complejo mayor de histocompatibilidad tipo II o DR. (B) Análisis molecular para los mismos marcadores realizado mediante la técnica de transcripción inversa. Líneas 1-4 células derivadas de cuatro placentas diferentes, línea 5 control negativo. Como gen control se analizó la expresión del gen gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

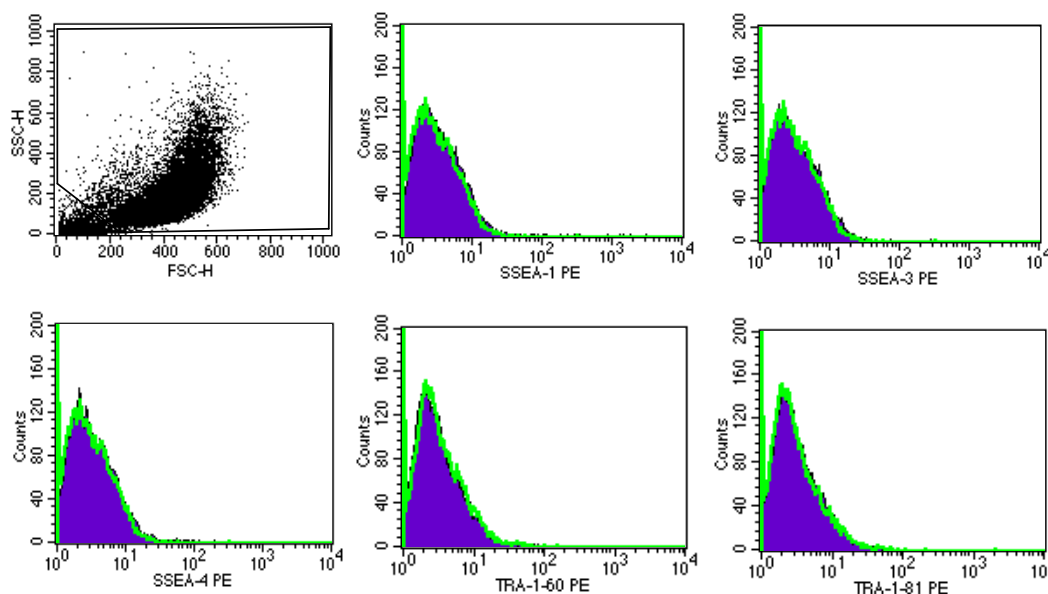
En resumen, el estudio de la expresión del sistema de histocompatibilidad (Figura 21) y de las moléculas coestimuladoras del sistema inmune (Figura 22), sugiere que las células de tipo mesenquimal derivadas de la placenta humana presentan una baja inmunogenicidad y pueden ser unas candidatas idóneas para su uso futuro en trasplante celular.



**Figura 22.- Análisis de moléculas coestimuladoras del sistema inmune.** Análisis mediante citometría de flujo de CD40, CD80 y CD86, tres moléculas encargadas de la señal secundaria de activación de los linfocitos T y B. Las células derivadas del saco amniótico de la placenta no expresan en su superficie ninguno de estos marcadores.

**4.3.- Estudio de la expresión de marcadores de células embrionarias:** Las células madre embrionarias se caracterizan por expresar antígenos específicos de estado embrionario denominados SSEAs. Se han definido tres antígenos de estado embrionario: SSEA-1, SSEA-3 y SSEA-4. Estos antígenos SSEAs aparecen en el embrión preimplantacional en forma de glicolípidos y su expresión cambia de forma significativa durante la embriogénesis (Varki y col., 2004). Las dos proteínas de tipo proteoglicano TRA-1-60 y TRA-1-81 se expresan en las células de la masa interna del embrión y se van perdiendo de forma progresiva según avanza la diferenciación y especialización de las células del embrión (Pera y col., 2000). La expresión de estos marcadores de células embrionarias SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 y TRA-1-81 es indicativa de pluripotencia y de células indiferenciadas. Estos antígenos se han identificado también en células madre adultas tales como células fetales de naturaleza mesenquimal (Guillot y col., 2007) y en diversas poblaciones de células madre aisladas

del saco amniótico de la placenta humana (Miki y col., 2005 y Strakova y col., 2008). Con el fin de determinar la posible expresión de estos marcadores embrionarios en las células aisladas en nuestro laboratorio se estudió su presencia mediante citometría de flujo. Los resultados obtenidos muestran que las células derivadas del saco amniótico de la placenta humana no presentan expresión de ninguno de los marcadores embrionarios analizados (Figura 23).

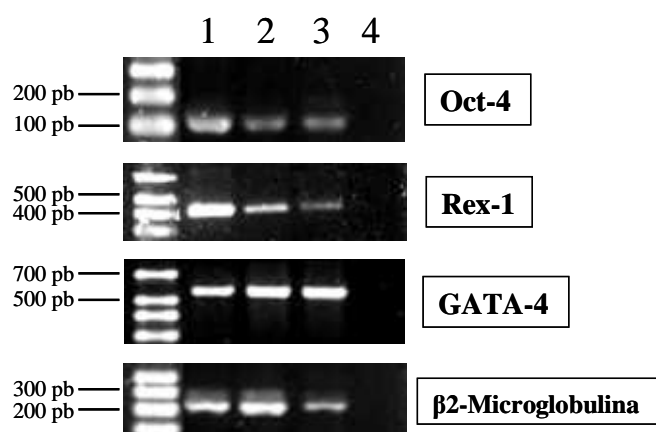


**Figura 23.- Estudio de marcadores de células madre embrionarias.** Mediante citometría de flujo se ha determinado la expresión de los marcadores embrionarios SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 y TRA-1-81. Las células derivadas del saco amniótico de la placenta humana no expresan en su superficie ninguno de los marcadores asociados a las células madre embrionarias.

Las células madre embrionarias expresan además una serie de factores de transcripción que ejercen un papel importante durante el desarrollo embrionario. Por ejemplo, Oct-4 y Rex-1 son dos factores de transcripción que regulan la totipotencia de las células embrionarias, de tal forma que, una disminución en la expresión de estos factores significa una diferenciación hacia trofoectodermo, mientras que un aumento en su expresión hará que las células deriven hacia la línea endo y mesodérmica. Además, estos factores de transcripción presentan una clara relación entre sí, de tal manera, que un aumento o descenso en la expresión de Oct-4 provoca una inmediata regulación en la expresión de Rex-1. La expresión de estos factores en células madre adultas se ha asociado con una mayor plasticidad de dichas células (Roche y col., 2007). Existen

otros factores de transcripción importantes durante el desarrollo embrionario pues están implicados en la diferenciación de los tejidos mesodérmicos y endodérmicos. Estos factores pertenecen a la familia GATA. Concretamente, GATA-4 es un factor que juega un papel crítico en la especificación temprana tanto del endodermo como del mesodermo (Roche y col., 2007).

Dada la importancia de estos tres factores en el control de la plasticidad de las células madre, se ha analizado su expresión en las células de la decidua humana mediante el análisis molecular del ARN purificado. Como se puede observar en la figura 24, las células tipo mesenquimal derivadas de la placenta humana expresan los tres marcadores en todos los casos analizados. Estos resultados indican que las células obtenidas de la decidua pueden presentar una elevada plasticidad. En resumen, las células obtenidas de la placenta expresan algunos de los marcadores embrionarios (Oct-4, Rex-1 y GATA-4) pero no otros (SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 y TRA-1-81), indicando que se trata de células en un estadio más maduro que el de las células embrionarias y germinales.



**Figura 24.- Análisis mediante RT-PCR de los factores de transcripción implicados en plasticidad.** Las líneas 1-3 representan células aisladas de tres placentas diferentes, la línea 4 muestra el control negativo de la RT-PCR. Como gen control se analizó la expresión de  $\beta 2$ -microglobulina.



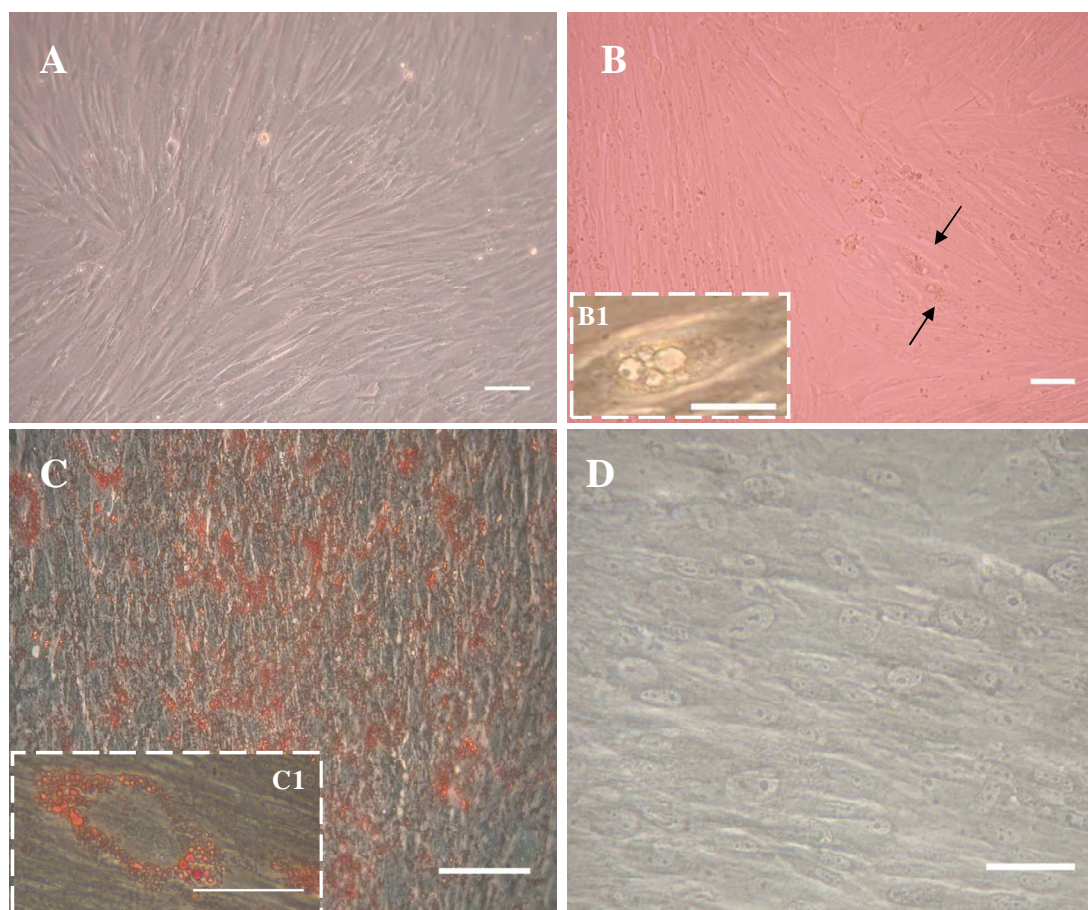
## **5.- Estudio de la capacidad de diferenciación *in vitro* de las células derivadas del saco amniótico de la placenta humana:**

Dado que las células obtenidas de la placenta humana con el procedimiento utilizado en nuestro laboratorio expresan marcadores implicados en la plasticidad de las células madre, decidimos estudiar la capacidad de diferenciación de estas células bajo las condiciones adecuadas hacia tejidos derivados de las tres capas embrionarias. Desde el punto de vista de los derivados mesodérmicos se ha analizado la capacidad de diferenciación hacia los linajes adiposo, óseo, cartilaginoso, muscular y cardíaco. Como linajes endodérmicos se ha estudiado la capacidad de diferenciación hacia tejido hepato-pancreático y pulmonar. Finalmente, como tejido ectodérmico se ha estudiado la capacidad de diferenciación hacia células del tejido nervioso. En todos los estudios de diferenciación se han usado como control negativo fibroblastos adultos de piel humana para comprobar que los resultados obtenidos no se debían a efectos artefactuales del procedimiento utilizado en cada caso. Además, como control negativo de los marcadores de diferenciación estudiados se han utilizado las células sin diferenciar.

### **5.1.- Diferenciación hacia el linaje mesodérmico.**

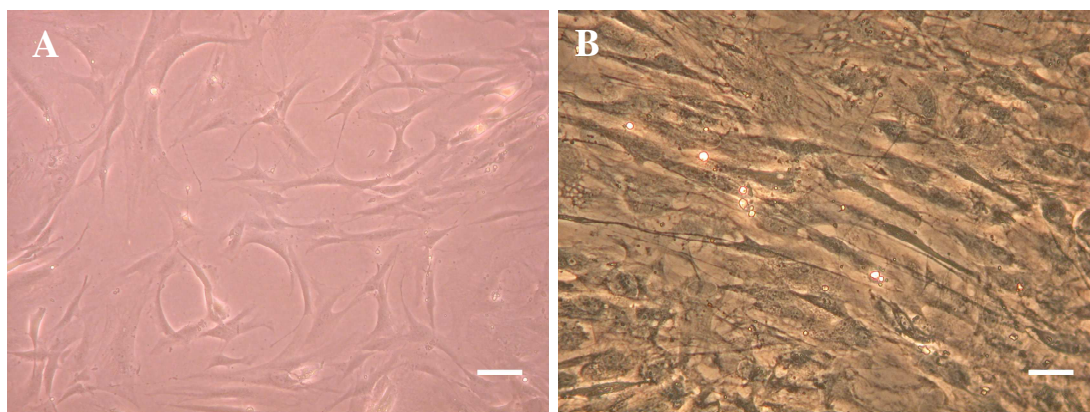
**5.1.1.- Diferenciación Adipogénica:** La diferenciación adipogénica de las células tipo mesenquimal obtenidas de la decidua se pone de manifiesto por la progresiva aparición de gotas de grasa en el interior de las células. Estas gotas de grasa empiezan a apreciarse a partir del octavo día de haberse iniciado la diferenciación (Figura 25 B) y se van haciendo mayores en tamaño y número conforme ésta avanza (Figura 25 B1). La diferenciación se evaluó mediante la tinción de las gotas de grasa con Oil Red O que aparecen de color rojo brillante al visualizarlas bajo contraste de fases en el microscopio (Figura 25 C y C1). Como se aprecia en la figura 25 C, existe un alto grado de diferenciación hacia adipocitos de las células tipo mesenquimal de saco amniótico de la placenta. Además, las células sin diferenciar son negativas para dicha tinción (Figura 25 D).

Para verificar la capacidad de diferenciación adipogénica de las células obtenidas de la decidua, fibroblastos adultos de piel se incubaron bajo las mismas condiciones de diferenciación adipogénica que las células derivadas de la decidua (Figura 26). Bajo



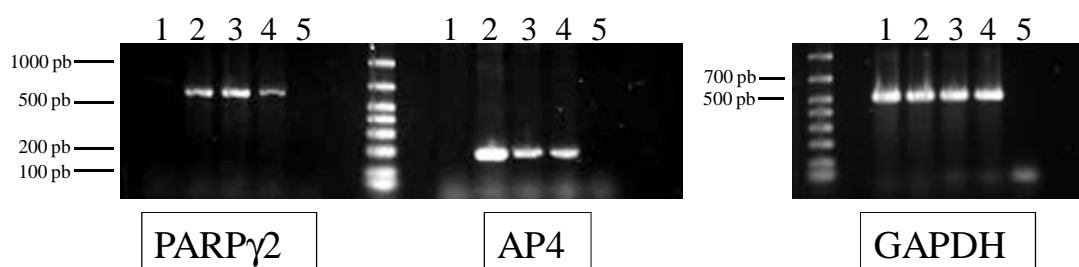
**Figura 25.- Diferenciación adipogénica de las células mesenquimales obtenidas del saco amniótico.** (A) Células control sin diferenciar; (B) Células después de ocho días de inducción adipogénica donde ya se aprecia la aparición de acúmulos de grasa en algunas células ( $\rightarrow$ ); (B1) Detalle de los acúmulos de grasa contenidos en las células al final de la diferenciación; (C) Tinción con Oil Red O de los adipocitos obtenidos de la diferenciación donde pueden observarse los acúmulos de grasa generados durante la misma teñidos de rojo. (C1) Detalle de una célula después de la diferenciación teñida con Oil Red. (D) Células sin diferenciar teñidas con Oil Red. Las barras de escala representan 200  $\mu\text{m}$  excepto en B1 que representan 20  $\mu\text{m}$ .

estas condiciones, los fibroblastos de piel continuaron proliferando y las células se tuvieron que fijar en el tercer ciclo de inducción, debido a que el crecimiento continuo de la población celular generó la desestabilización de la misma. Asimismo, los fibroblastos de piel humana no presentaron acúmulos de grasa en su interior y fueron negativos en la tinción con Oil Red O. Estos datos indican que con las condiciones empleadas en nuestro laboratorio los fibroblastos adultos no son capaces de diferenciarse hacia adipocitos.



**Figura 26.- Fibroblastos adultos de piel humana cultivados en medio de diferenciación adipogénica.** (A) Fibroblastos de piel antes del proceso de diferenciación. (B) Fibroblastos teñidos con Oil Red O después de 17 días en medio de diferenciación adipogénica. Las barras de escala representan 200  $\mu\text{m}$ .

Para confirmar la diferenciación de las células de tipo mesenquimal derivadas de la decidua hacia adipocitos, se analizó la expresión de genes característicos del tejido adiposo a partir del ARN purificado al final de la diferenciación (Figura 27). Se ha analizado la expresión de la proteína de unión a ácidos grasos 4 (AP4) y del receptor gamma 2 de peroxisomas proliferativos activados (PPAR $\gamma$ 2), tanto en células derivadas del saco amniótico sin diferenciar (línea 1) como en células diferenciadas procedentes de tres placentas diferentes (líneas 2-4). Los resultados muestran que tanto PPAR $\gamma$ 2 como AP4 se expresan únicamente en las células después del proceso de diferenciación adipogénica.

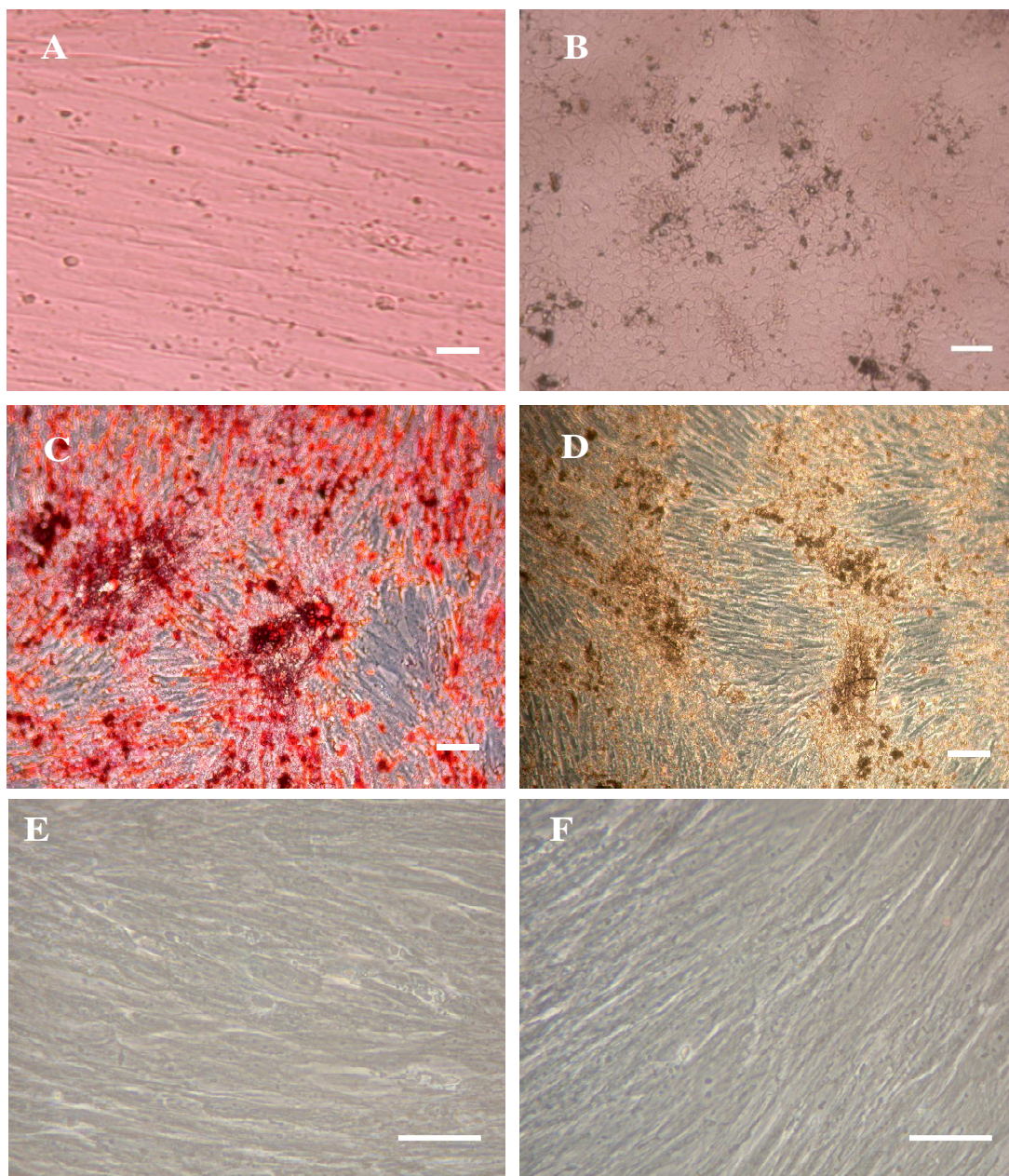


**Figura 27.- Análisis de los genes característicos del tejido adiposo como marcadores de diferenciación adipogénica de las células de la decidua.** Línea 1: Células derivadas del saco amniótico sin diferenciar; líneas 2-4 células diferenciadas hacia el linaje adipogénico procedentes de tres placentas diferentes; línea 5: control negativo de la RT-PCR. Como gen control se analizó la expresión del gen para gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

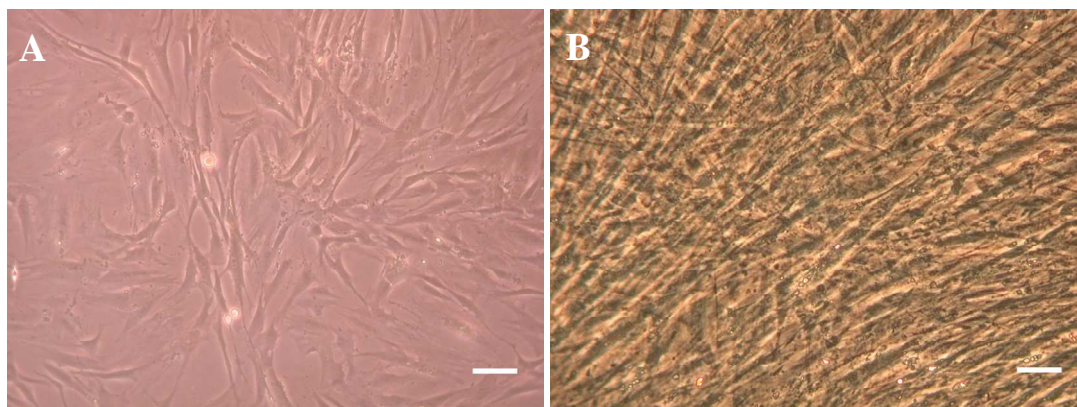
**5.1.2.- Diferenciación Osteogénica:** Después de veintiún días en medio de diferenciación osteogénica el grado de diferenciación obtenido en las células derivadas de la decidua se evaluó mediante tinción de la matriz de calcio extracelular formada y la presencia de actividad fosfatasa alcalina, una enzima que está implicada en la mineralización del hueso (Figura 28). A los ocho días de iniciada la diferenciación, se observó un cambio en la morfología de las células hacia una morfología casi esférica característica del estado diferenciado (Figura 28 B). Al final de la diferenciación, la matriz extracelular de calcio formada se visualizó mediante la tinción con Alizarín Red S (Figura 28 C). Las células diferenciadas presentaron, además, unos niveles altos de fosfatasa alcalina (Figura 28 D). Sin embargo, las células sin diferenciar son negativas para ambos tipos de tinción (Figura 28 E y F). Estos datos indican que las células obtenidas de la placenta humana, presentan la capacidad de generar osteocitos *in vitro*. Es importante destacar que existe un alto grado de diferenciación a osteocitos de las células tipo mesenquimal de la decidua, observándose células diferenciadas en casi la totalidad del cultivo.

Como control negativo de la diferenciación se utilizaron, además, fibroblastos adultos de piel humana incubados en el mismo medio de diferenciación osteogénica. Durante el proceso, los fibroblastos no cambiaron su morfología de forma considerable y su tasa de división celular se mantuvo estable. Debido al sobrecrecimiento celular la población se desestabilizó a los 17 días del comienzo de la diferenciación, por lo que se procedió a la tinción de las mismas con Alizarín Red S (Figura 29). Como se observa, los fibroblastos de piel sometidos al proceso de diferenciación osteogénica fueron negativos para dicha tinción, indicando que estas células no son capaces de diferenciarse *in vitro* hacia células del linaje osteogénico con las condiciones utilizadas.



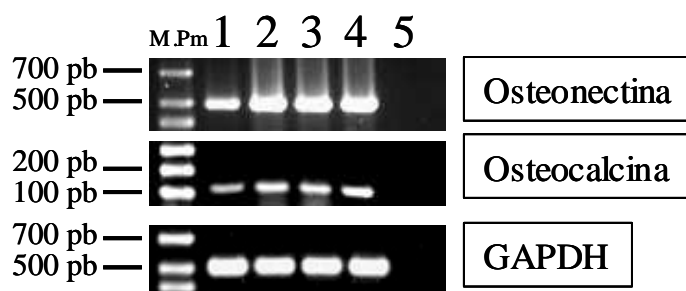


**Figura 28.- Diferenciación a osteocitos de las células de tipo mesenquimal obtenidas del saco amniótico.** (A) Células sin diferenciar. (B) Células en medio de diferenciación después de 21 días de inducción donde se aprecia el cambio de morfología de fibroblasto a una morfología casi esférica característica del estado diferenciado. (C) Células teñidas con Alizarin Red S vistas en contraste de fases a los 21 días de inducción. (D) Las células presentan niveles altos de fosfatasa alcalina, una enzima implicada en la mineralización de la matriz del hueso. (E) Tinción con Alizarín Red S de las células sin diferenciar y (F) tinción con SIGMA FAST de las células sin diferenciar Barras de escala de 200  $\mu\text{m}$ .



**Figura 29.- Fibroblastos de piel adultos cultivados en medio de diferenciación osteogénica.** (A) Fibroblastos antes del proceso de diferenciación. (B) Células teñidas con Alizarin Red S después de 17 días de diferenciación. Las barras de escala representan 200  $\mu\text{m}$ .

Mediante el análisis del ARN purificado a partir de las células diferenciadas, se ha analizado la expresión de dos genes característicos del tejido óseo (Figura 30). Estos dos genes codifican para las proteínas osteocalcina y osteonectina que están implicadas en la unión de iones de calcio durante la osteogénesis. Como se puede apreciar las células sin diferenciar ya expresan el transcrito activo para ambos genes, aunque su expresión aumenta tras la diferenciación.



**Figura 30.- Estudio de genes característicos de la osteogénesis como marcadores de diferenciación osteogénica de las células de la decidua.** Línea 1: Células sin diferenciar; Líneas 2-4: Células procedentes de tres placentas distintas diferenciadas hacia el linaje osteogénico, Línea 5: Control negativo. GAPDH se ha utilizado como control de carga.

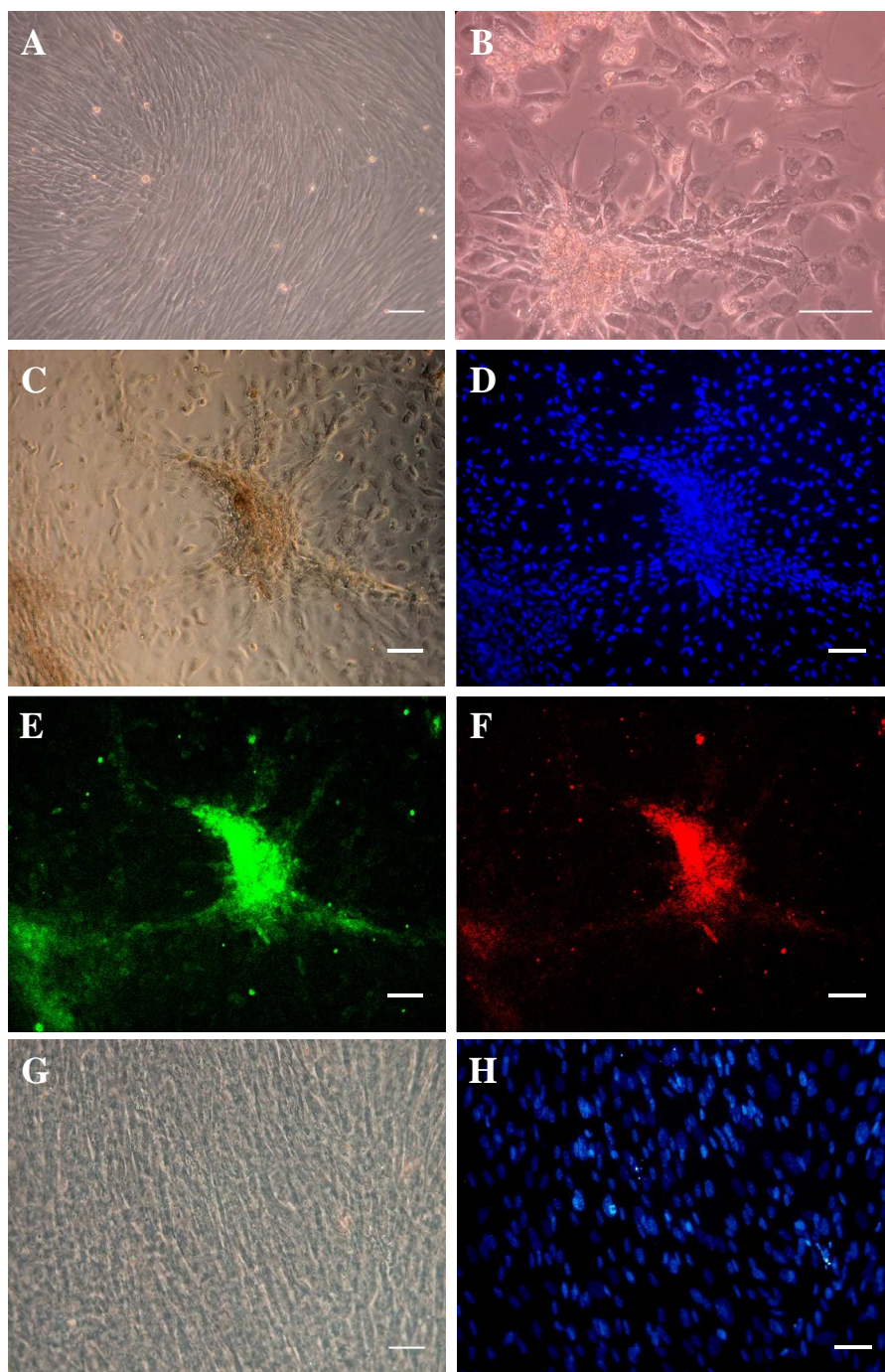
El análisis por densitometría de las bandas demostró que la expresión de osteocalcina aumenta su expresión 1,59 veces en las células diferenciadas respecto a las células no diferenciadas. De igual forma, la expresión de osteonectina es 1,71 veces superior en las células sometidas al proceso de diferenciación.

**5.1.3.- Diferenciación Condrogénica:** Después de los veintiún días que dura el proceso de diferenciación condrogénica, las células presentaron un acusado cambio morfológico (Figura 31 A y B). Al mismo tiempo, se produjo la formación de una matriz extracelular tridimensional formada por el proteoglicano condroitin sulfato. Este proceso se evidenció por la detección mediante inmunocitoquímica de las proteínas condroitin sulfato (Figura 31 E) y agrecan (Figura 31 F), ambas componentes esenciales de la matriz extracelular del cartílago. Las células sin diferenciar son negativas para ambos tipos de tinción (Figura 31 G y H). Estos datos indican que las células obtenidas de la decidua presentan la capacidad de diferenciarse al linaje cartilaginoso *in vitro*. Esta capacidad de diferenciación condrogénica de las células tipo mesenquimal del saco amniótico de la placenta se observó casi en la totalidad de las células que componían el cultivo.

Los fibroblastos de piel adultos cultivados en medio de diferenciación condrogénica no presentaron cambios en su morfología después de diecisiete días, momento en el que se detuvo la diferenciación debido al desequilibrio de la población celular provocado por el continuo crecimiento de la misma. Igualmente, no se detectó la expresión de la proteína agrecan en su superficie mediante inmunocitoquímica (Figura 32).

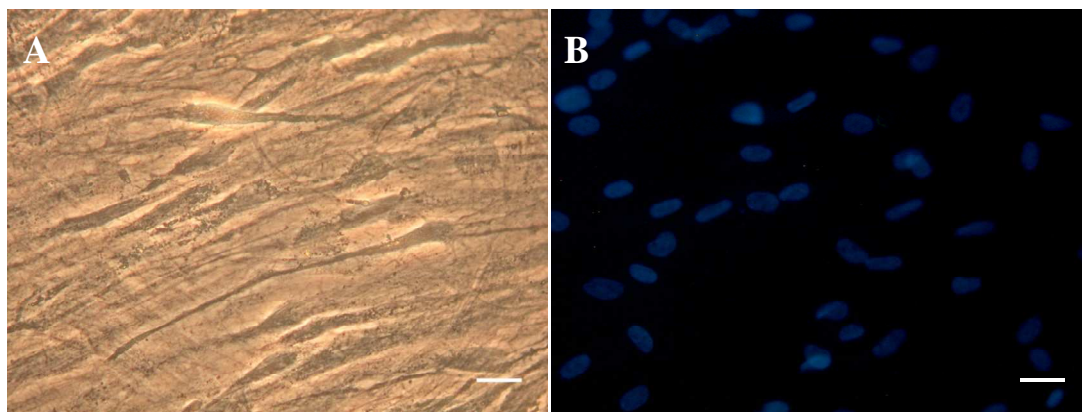
El ARN purificado a partir de las células diferenciadas revela la expresión de Colágeno tipo II, el colágeno fibrilar del cartílago, y Sox-9, un gen que actúa durante la diferenciación de los condrocitos (Figura 33). Por el contrario, no existe expresión de estas dos proteínas en las células sin diferenciar.





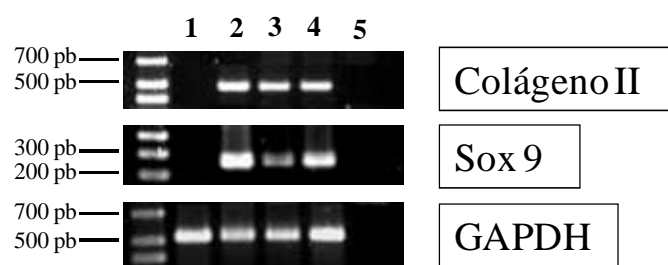
**Figura 31.- Diferenciación Condrogénica de las células obtenidas del saco amniótico.** (A) Células sin diferenciar. (B-C) Células en medio de diferenciación después de 21 días de inducción. (C-F) Mediante inmunofluorescencia se detecta la expresión de las proteínas condroitin sulfato (E) y agreccan (F). (G-H) Contraste de fases e inmunofluorescencia de células sin diferenciar para condroitin sulfato (verde) y agreccan (rojo). Núcleos teñidos en azul con DAPI. Las barras de escala representan 200  $\mu\text{m}$ .





**Figura 32.- Fibroblastos de piel cultivados en medio de diferenciación condrogénica.**

(A) Contraste de fases de células después de diecisiete días en medio de diferenciación condrogénica. (B) Inmunofluorescencia para la proteína agrecan en verde (FITC). Núcleos teñidos en azul con DAPI. Las barras de escala corresponden a 100  $\mu\text{m}$ .

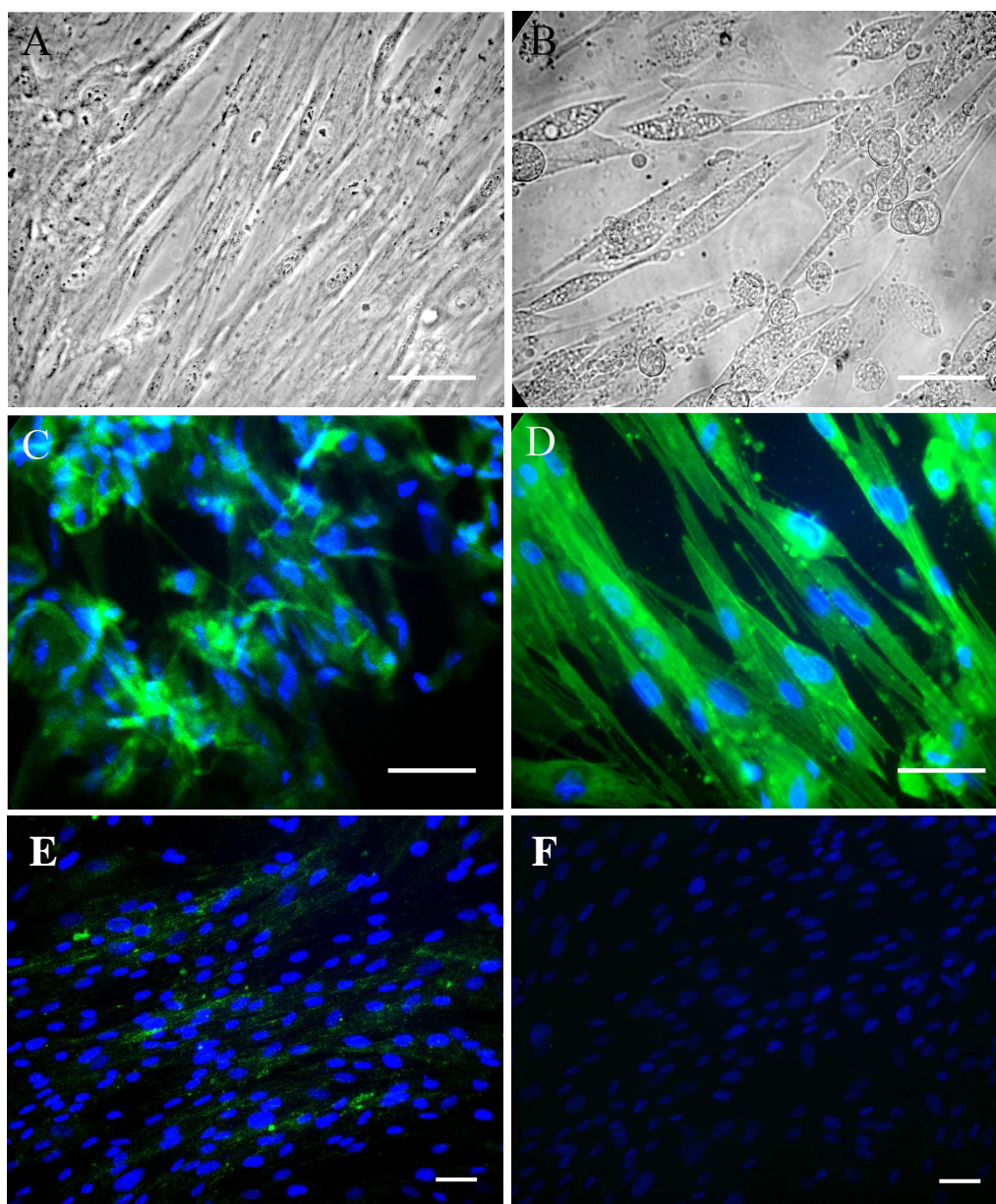


**Figura 33.- Estudio de los genes característicos del cartílago en las células derivadas de la placenta humana después del cultivo en medio de diferenciación condrogénica.**

Línea 1: Células sin diferenciar. Líneas 2-4: Células diferenciadas obtenidas de tres placentas diferentes. Línea 5: Control negativo de la RT-PCR. GAPDH se ha utilizado como gen control de la RT-PCR.

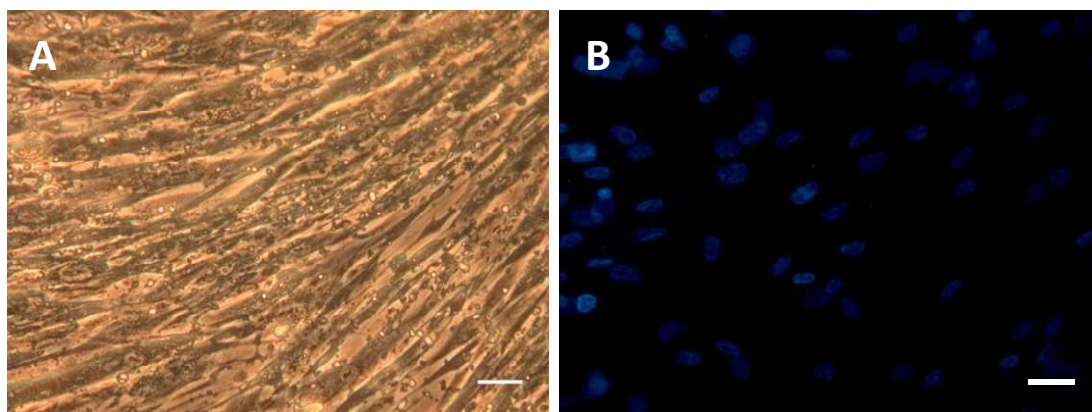
**5.1.4.- Diferenciación Miogénica:** La diferenciación muscular se puso de manifiesto por un evidente cambio en la morfología de las células después de 14 días en medio de diferenciación (Figura 34 A y B). Las células diferenciadas presentan una morfología fusiforme característica de los precursores de miotubos (Figura 34 B). Además, mediante inmunocitoquímica, se evaluó la expresión de miosina (Figura 34 C) y  $\alpha$ -actinina (Figura 34 D) que son dos proteínas características del músculo esquelético. Las células sin diferenciar no expresan ninguna de las dos proteínas estudiadas (Figura 34 E y F). Estos datos indican que las células de tipo mesenquimal obtenidas de la decidua poseen la capacidad de diferenciarse hacia células musculares *in vitro*. Las

células presentan un alto grado de diferenciación muscular como se observó por el cambio de morfología de todas las células presentes en el cultivo.



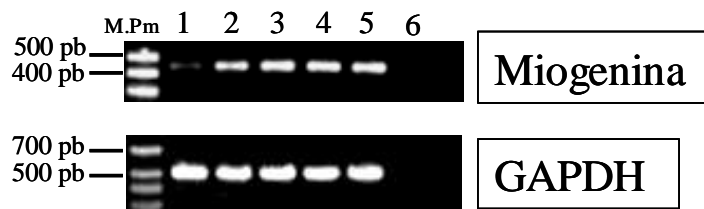
**Figura 34.- Diferenciación a músculo esquelético de las células derivadas del saco amniótico.** Mediante microscopía de contraste de fases se muestran células antes (A) y después de la diferenciación a músculo esquelético (B). La tinción de estas células mediante inmunofluorescencia muestra la expresión de miosina (C) y  $\alpha$ -actinina (D). Células sin diferenciar teñidas para  $\alpha$ -actinina (E) y miosina (F), ambas en verde. Núcleos teñidos con DAPI en azul. Las barras de escala corresponden a 200  $\mu$ m.

Como control de la diferenciación, fibroblastos de piel adultos se trataron con el protocolo de diferenciación muscular. Tras 14 días en medio de diferenciación, la población celular no muestra signos de diferenciación desde el punto de vista morfológico (Figura 35 A). Además, mediante inmunofluorescencia, se determinó que los fibroblastos de piel adultos son negativos para la miosina (Figura 35 B), indicando que éstos no se diferencian hacia el linaje muscular en las condiciones empleadas.



**Figura 35.- Fibroblastos de piel sometidos a diferenciación muscular.** (A) Fibroblastos después de catorce días en medio de diferenciación miogénica. (B) Mediante inmunofluorescencia no se detecta la expresión de miosina (teñida con FITC) en estas células. Núcleos teñidos con DAPI en azul. Barras de escala correspondientes a 100  $\mu$ m.

Mediante la reacción en cadena de la polimerasa se ha analizado, tanto en las células sin diferenciar como en las células después de la diferenciación muscular, la presencia de transcrito de miogenina, un factor de transcripción específico de músculo. Los resultados obtenidos en células provenientes de cuatro placentas diferentes mostraron

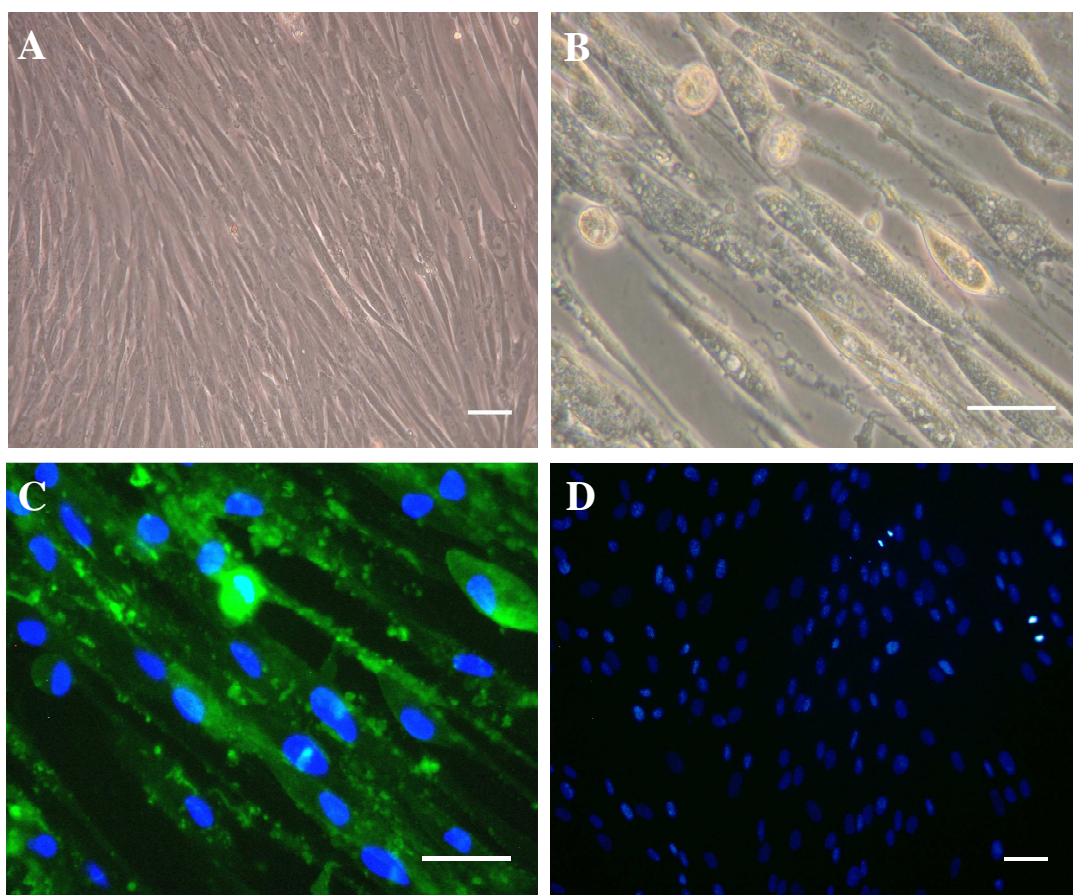


**Figura 36.- Análisis de la expresión de miogenina en las células de la placenta como marcador de diferenciación muscular.** Línea 1: células sin diferenciar; líneas 2-5: células procedentes de cuatro placentas diferentes después del proceso de diferenciación muscular; línea 6: control negativo de la RT-PCR. Como gen control se ha utilizado GAPDH.



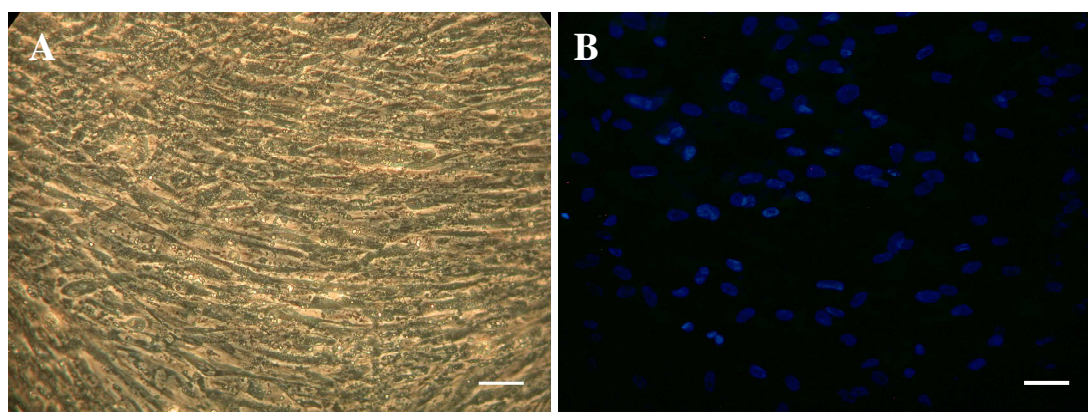
que las células sin diferenciar expresan el transcrito de miogenina pero su expresión se ve aumentada con la diferenciación (Figura 36). El análisis mediante densitometría de las bandas obtenidas en gel de agarosa indica que la expresión de miogenina alcanza un valor 3,15 superior en las células diferenciadas respecto a las células sin diferenciar.

**5.1.5- Diferenciación cardíaca:** La diferenciación cardíaca se evidencia por un cambio de morfología acusado en las células tras cuarenta días en medio de diferenciación (Figura 37). A pesar de que no se advirtió la presencia de células contráctiles, mediante inmunocitoquímica se observó la expresión de la proteína atrial natriurética (ANP de sus siglas en inglés “*Atrial Natriuretic peptide*”) que se expresa principalmente en el músculo cardíaco. Las células sin diferenciar no expresan esta proteína (Figura 37 D).

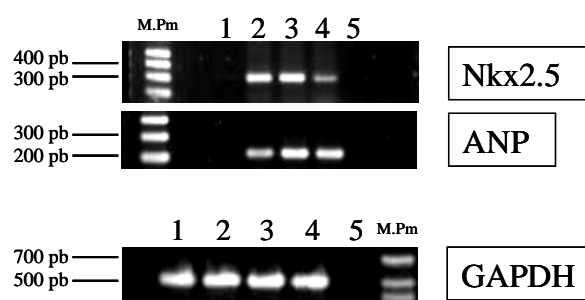


**Figura 37.- Diferenciación cardíaca de las células derivadas del saco amniótico.** (A) Células sin diferenciar. (B) Células después de 40 días en medio de diferenciación muscular. (C) Inmunocitoquímica para la proteína atrial natriurética. (D) Células sin diferenciar teñidas mediante inmunocitoquímica para la proteína atrial natriurética. Núcleos teñidos con DAPI. Las barras de escala representan 200  $\mu\text{m}$ .

Como control negativo de la diferenciación cardíaca, fibroblastos de piel adultos se mantuvieron durante treinta y cinco días en el medio de diferenciación cardíaca (Figura 38). Durante este periodo de tiempo las células no sufren los cambio morfológicos acusados que experimentan las células derivadas de la decidua humana, sino que se vacuolizaron abundantemente (Figura 38 A). La tinción mediante inmunofluorescencia para la proteína atrial natriurética revela que los fibroblastos de piel en medio de diferenciación cardíaca no expresan esta proteína, indicando que estas células no se diferencian hacia el linaje cardíaco con las condiciones empleadas.



**Figura 38.- Fibroblastos de piel sometidos a diferenciación cardíaca.** (A) Células después de 35 días en medio de diferenciación cardíaca. (B) Inmunofluorescencia para la proteína atrial natriurética teñida con FITC. Núcleos teñidos en azul con DAPI. Las barras de escala representan 200  $\mu$ m.

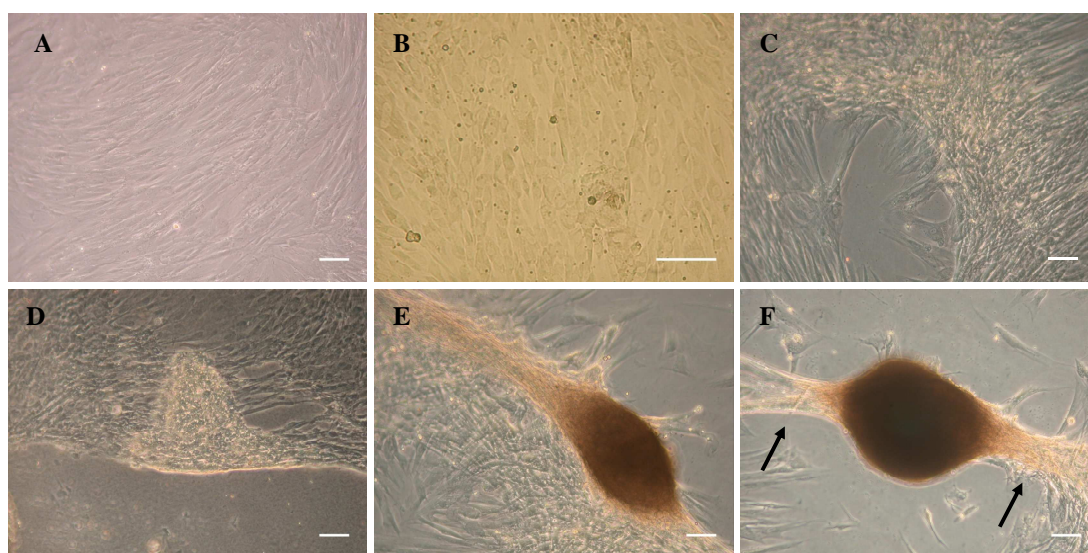


**Figura 39.- Análisis de genes característicos del músculo cardíaco como marcadores de la diferenciación de las células de la decidua.** Línea 1: células sin diferenciar; líneas 2-4: células diferenciadas a músculo cardíaco pertenecientes a tres placentas diferentes; línea 5: control negativo. Como control de la RT-PCR se ha utilizado el gen de GAPDH.

Para confirmar la diferenciación, mediante RT-PCR se evaluó la expresión de marcadores característicos de músculo cardíaco como son la proteína atrial natriurética y el homeobox cardíaco NKx2.5 (Figura 39). Las células sin diferenciar no presentaron expresión de estos marcadores, mientras que la diferenciación indujo la expresión de ambos marcadores en todos los casos analizados.

## 5.2.- Diferenciación hacia el linaje endodérmico.

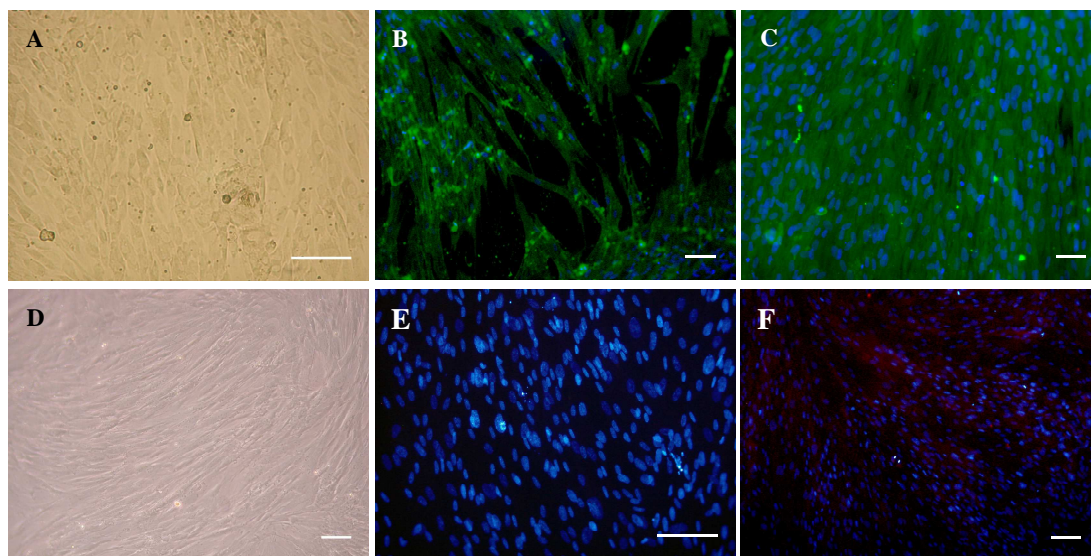
**5.2.1.- Diferenciación Hepato-Pancreática:** Durante el proceso de diferenciación se observa un cambio morfológico acusado en las células hasta que finalmente se produce la formación de hepatoesferas, que son precursores de tipo hepato-pancreático (Figura 40). El proceso de formación de una hepatoesfera comprende en primer lugar, un cambio morfológico de las células. Nótese que las células se han acortado notablemente adquiriendo una morfología cuboide (Figura 40 B). Las células empiezan a agruparse y alrededor de estos grupos celulares se irá formando una vaina fibrosa (Figura 40 C-E) que finalmente acogerá a todas las células formando la hepatoesfera (Figura 40 F). Estos cuerpos fibrosos tridimensionales se encuentran adheridos a la placa de cultivo mediante la vaina fibrosa (Figura 40 F).



**Figura 40.- Proceso de formación de una hepatoesfera.** (A) Células sin diferenciar. (B) A los 8 días de iniciada la diferenciación se produce un cambio en la morfología de las células. (C-E) Las células empiezan a agruparse y se rodean de una vaina fibrosa. (F) La hepatoesfera final queda adherida a la placa de cultivo mediante esa vaina fibrosa (indicada mediante flechas). Las barras de escala representan 200  $\mu\text{m}$ .

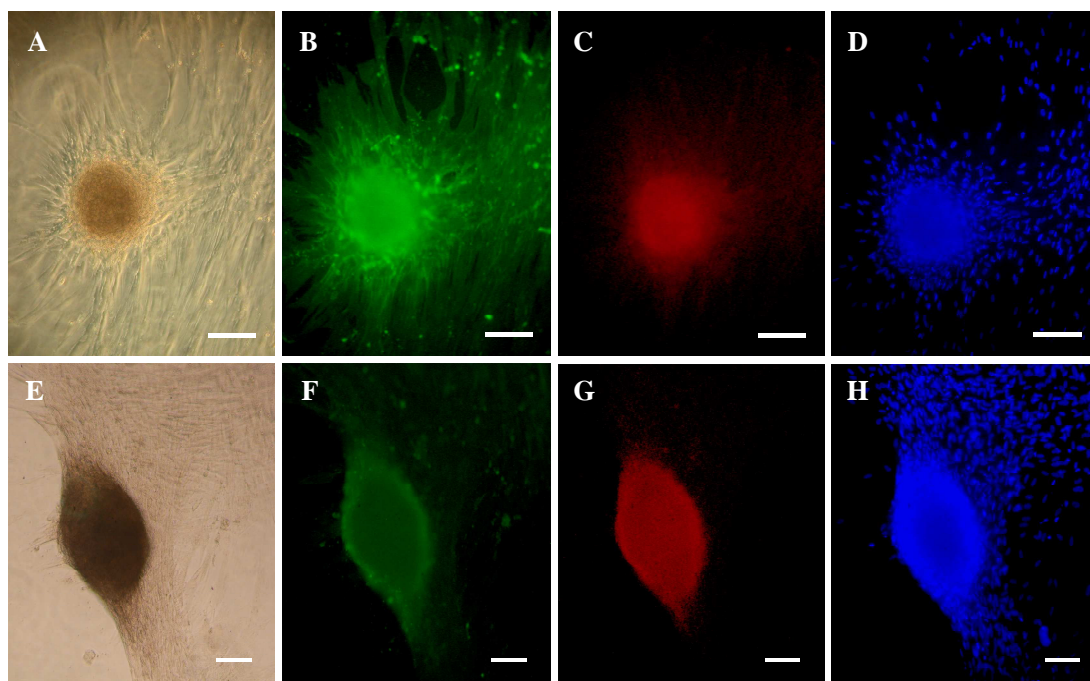


Ya en los primeros estadios de diferenciación se aprecia la expresión de marcadores típicos de células progenitoras de hígado (Figura 41). A los 8-10 días post-inducción se observa que las células producen albúmina (Figura 41 B) y expresan el receptor del factor de crecimiento hepático (HGF-r) (Figura 41 C). Las células sin diferenciar no expresan albúmina (Figura 41 E) y expresan bajos niveles del receptor del factor de crecimiento hepático (Figura 41 F).



**Figura 41.- Expresión de marcadores hepáticos en los primeros estadios de diferenciación hepato-pancreática y en las células derivadas de la decidua.** (A) Células a los 8 días post-inducción donde se observa su morfología cuboide. (B) Después de 8 días de inducción las células producen albúmina (verde). (C) Expresión del HGF-r después de 10 días de inducción (verde). (D) Células de la decidua sin diferenciar. (E) Inmunofluorescencia en células sin diferenciar para albúmina en verde y (F) para HGF-r en rojo. Núcleos teñidos con DAPI (azul). Las barras de escala corresponden a 200  $\mu$ m.

Una vez se han formado completamente las hepatoesferas, las células expresan marcadores típicos tanto de hígado, albúmina (Figura 42 A),  $\alpha$ -fetoproteína (Figura 42 B) y HGF-r (Figura 42 F), como de páncreas, insulina (Figura 42 G). Estos datos indican que las células de tipo mesenquimal obtenidas del saco amniótico poseen la capacidad de diferenciarse con una alta eficiencia hacia células precursoras hepato-pancreáticas *in vitro*.

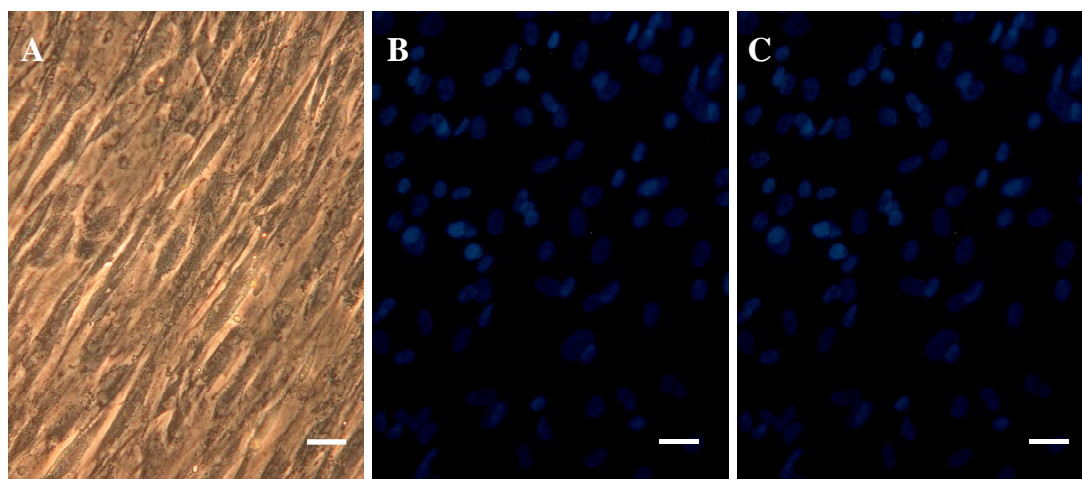


**Figura 42.- Expresión de marcadores hepato-pancreáticos en los cuerpos fibrosos tridimensionales.** (A y E) Contraste de fases de una hepatoesfera. Mediante inmunocitoquímica se muestra la expresión de (B) albúmina; (C)  $\alpha$ -fetoproteína; (F) del receptor del factor de crecimiento hepático; (G) y del marcador pancreático Insulina. (D y H) Núcleos teñidos con DAPI. Barras de escala correspondientes a 200  $\mu$ m.

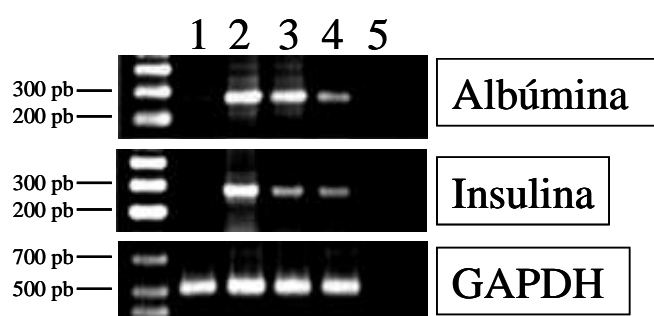
Además, como control negativo de la diferenciación se utilizaron fibroblastos adultos de piel, que no experimentaron ningún cambio en su morfología durante el proceso y se mantuvieron en monocapa celular (Figura 43 A). Asimismo, mediante inmunocitoquímica no se detectó expresión ni de albúmina (Figura 43 B) ni de insulina (Figura 43 C).

Para confirmar la diferenciación se estudió la expresión de los genes que codifican para albúmina e insulina, dos proteínas características de la diferenciación hepato-pancreática (Figura 44). Las células diferenciadas expresan a nivel de ARN mensajero tanto albúmina como insulina. Estos dos genes no se expresan, sin embargo, en las células control, confirmando la diferenciación de las células de la decidua hacia el linaje hepato-pancreático (Figura 44).





**Figura 43.- Fibroblastos de piel adultos sometidos a diferenciación hepato-pancreática.** (A) Contraste de fases. (B) Inmunofluorescencia para albúmina en verde. (C) Inmunofluorescencia para insulina en rojo. Núcleos teñidos con DAPI. Las barras de escala corresponden a 100  $\mu\text{m}$ .



**Figura 44.- Análisis de la expresión de marcadores hepato-pancreáticos mediante RT-PCR como indicador de la diferenciación de las células de la decidua.** Línea 1: células sin diferenciar; líneas 2-4: células diferenciadas hacia el linaje hepato-pancreático correspondientes a tres placentas distintas; línea 5: control negativo de la RT-PCR. Albúmina es un marcador de diferenciación hepática e insulina de diferenciación pancreática. Como gen control se analiza la expresión de GAPDH.

La acumulación de glicógeno es una característica funcional esencial de las células hepáticas. Se trata de una molécula de almacenamiento de energía a corto plazo que se deposita en forma de pequeños gránulos en el citoesqueleto tanto de los hepatocitos como de las células musculares (Alberts y col., 2004). Por lo tanto, para comprobar la funcionalidad de las células derivadas de la diferenciación hepato-pancreática se evaluó la presencia de glicógeno intracelular mediante la tinción con ácido periódico de Schiff.

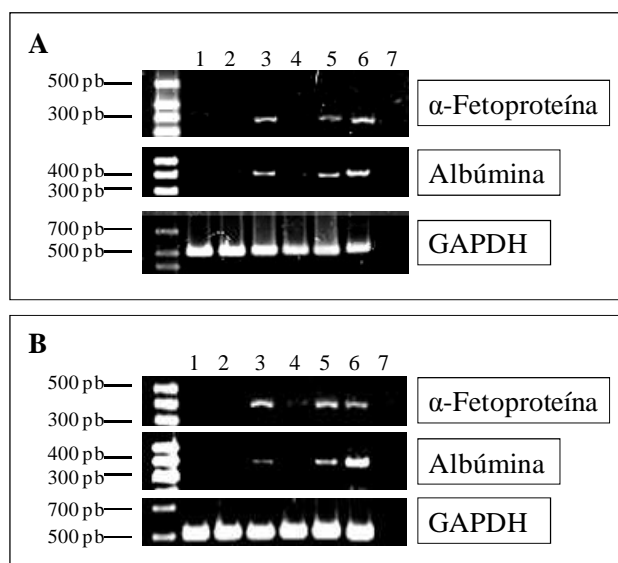
Las hepatoesferas obtenidas al final de la diferenciación hepato-pancreática presentan elevados niveles de glicógeno intracelular (Figura 45 D) y esta acumulación ya se pone de manifiesto desde los primeros estadios de formación de la hepatoesfera (Figura 45 B). Las células sin diferenciar, por el contrario, son negativas para la tinción de ácido periódico de Schiff (Figura 45 A). Estos resultados indican que las células de la decidua son capaces de diferenciarse hacia precursores de hepatocitos funcionales.



**Figura 45.- Tinción con ácido periódico Schiff de las células derivadas de la decidua diferenciadas hacia el linaje hepato-pancreático.** (A) Células derivadas de la decidua teñidas con el procedimiento de ácido periódico de Schiff. (B y C) Tinción de glicógeno intracelular en las células en distintos estadios del proceso de diferenciación hepato-pancreática. Las barras de escala representan 200  $\mu\text{m}$ .

Las células madre adultas desarrollan sus funciones de autorrenovación y mantenimiento de la homeostasis tisular, tanto en condiciones fisiológicas normales, como frente a una enfermedad o lesión en un microambiente tisular que se denomina nicho. Este microambiente es el encargado de controlar el destino y comportamiento de una célula progenitora en su tejido de residencia. Con el fin de estudiar el comportamiento de las células madre obtenidas de la decidua en un microambiente que simula las condiciones que se encontrarán en un sistema *in vivo*, las células se incubaron en presencia de tejido hepático sano y lesionado, utilizando un sistema de cocultivo en *transwell*. Como procedimiento de lesión hepática se ha elegido la inyección intraperitoneal de tetracloruro de carbono dado que se trata de una técnica sencilla, fácilmente reproducible y que proporciona una duración limitada de la inducción de fibrosis hepática (Jang y col., 2008). La fibrosis hepática supone un punto clave en la progresión de la cirrosis, que es la principal causa de muerte en pacientes con enfermedad hepática crónica. El efecto del tejido hepático sano y lesionado sobre las células de la decidua se ha estudiado mediante la expresión de  $\alpha$ -fetoproteína y

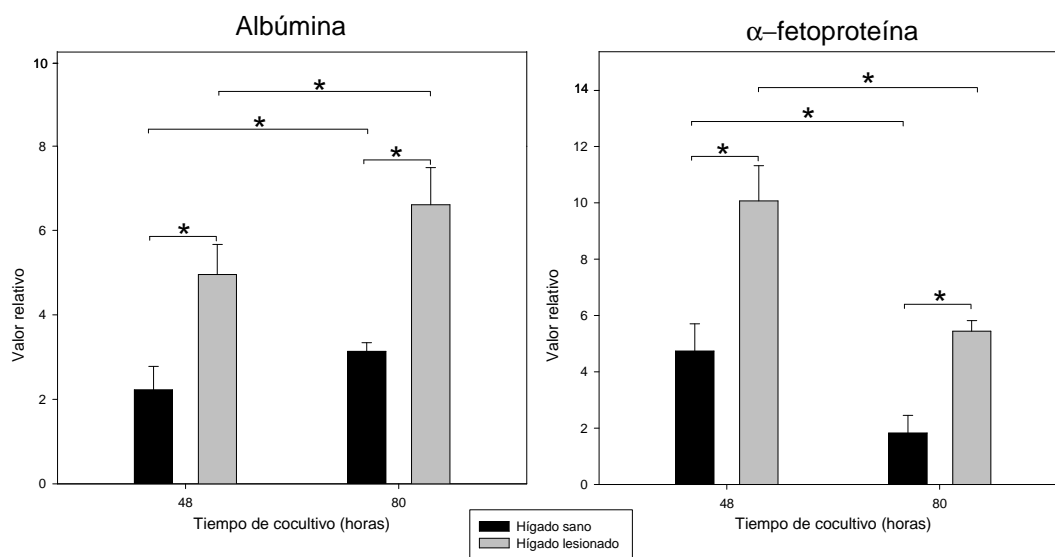
albúmina, dos genes implicados en el desarrollo y diferenciación hepática y cuya expresión se encuentra regulada a nivel transcripcional. En la figura 46 se presenta un ejemplo representativo de la expresión de dichos genes en las células de la decidua tras el cocultivo. Como se observa, tanto en presencia de hígado sano, como en presencia de hígado lesionado, las células derivadas de la decidua humana expresan  $\alpha$ -fetoproteína y albúmina aunque a distintos niveles.



**Figura 46.- Análisis del ARN purificado a partir de las células obtenidas del proceso de cocultivo con hígado sano y lesionado. Ejemplo representativo de tres experimentos realizados por triplicado. (A) Cocultivo en presencia de hígado sano y (B) cocultivo en presencia de hígado lesionado. En ambos paneles: línea 1: células de la decidua en medio normal de cultivo, línea 2: células de la decidua en medio de mantenimiento del cocultivo durante 48 horas; línea 3: células cocultivadas 48 horas con el tejido hepático; línea 4: células de la decidua en medio de mantenimiento del cocultivo 80 horas; línea 5: células cocultivadas 80 horas con el tejido hepático; línea 6: células diferenciadas in vitro al linaje hepato-pancreático; línea 7: control negativo de la RT-PCR. Como gen control se ha utilizado GAPDH.**

Mediante densitometría de las bandas obtenidas en los geles de agarosa de los tres experimentos analizados por triplicado, se han calculado los valores relativos de la expresión de  $\alpha$ -fetoproteína y albúmina en las células de la decidua tras el proceso de cocultivo. Dichos valores se han normalizado frente al gen control GAPDH, y se expresan como el aumento en los niveles de ARN mensajero respecto a las células

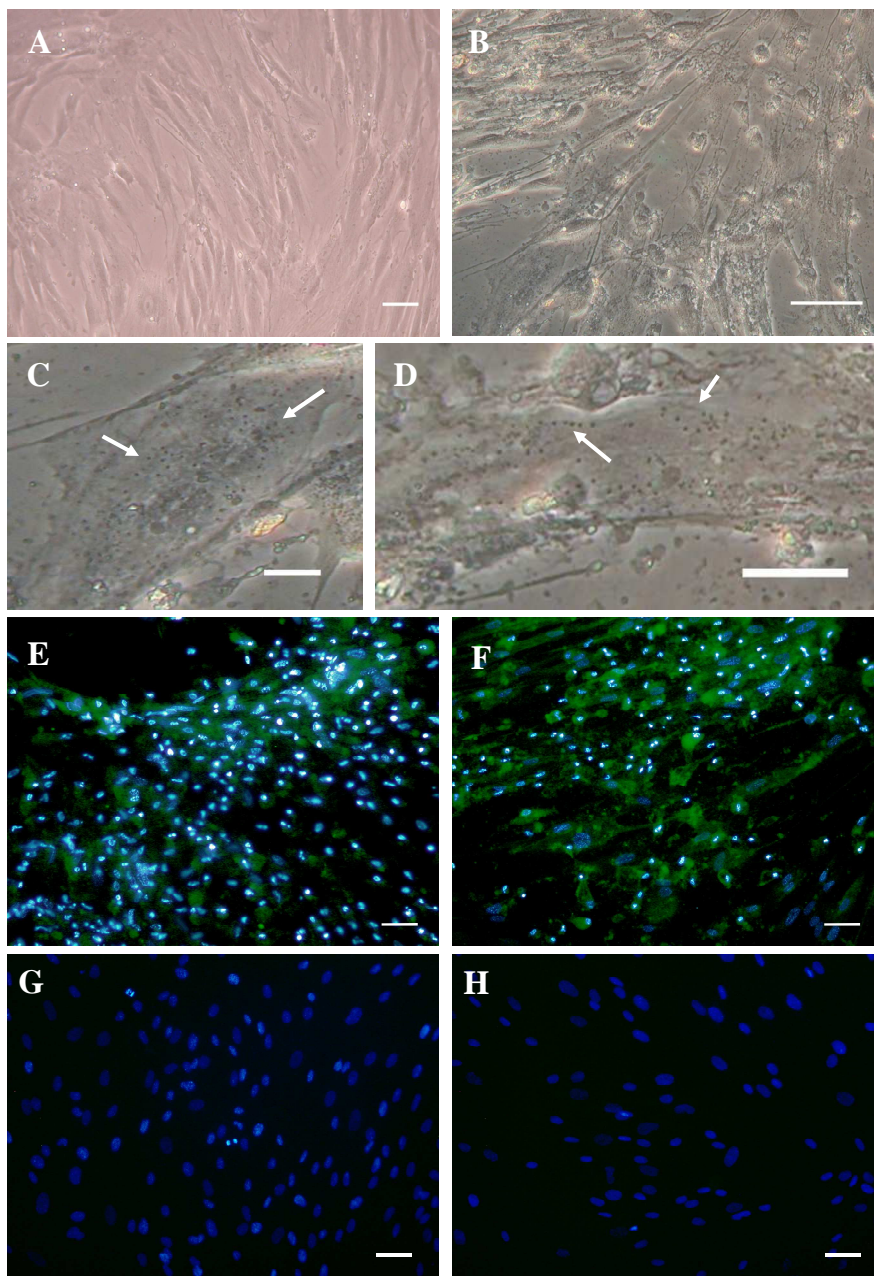
control cultivadas en ausencia de tejido. Los resultados obtenidos muestran que las células de la decidua, tanto en presencia de hígado sano como lesionado, inducen la expresión de  $\alpha$ -fetoproteína y albúmina, indicando la diferenciación de las células de la decidua hacia el linaje hepático.



**Figura 47.- Valores relativos obtenidos del análisis de los geles de agarosa de tres experimentos independientes analizados por triplicado.** Los valores se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar (\* $p < 0.01$  y  $n = 9$  para las comparaciones de hígado sano frente a lesionado y niveles de expresión a las 80 horas de cocultivo frente a los niveles a las 48 horas de cocultivo).

En el caso de  $\alpha$ -fetoproteína su expresión se induce de manera significativa al inicio del cocultivo (48 horas) para posteriormente ir disminuyendo progresivamente a medida que las células diferenciadas van adquiriendo una madurez hepática (80 horas) lo que se corresponde con el aumento paralelo en la expresión de albúmina durante el cocultivo. Este comportamiento de las células obtenidas de la decidua es similar tanto en el cocultivo con tejido sano como con tejido lesionado. No obstante, es importante resaltar que los valores de expresión tanto de  $\alpha$ -fetoproteína como de albúmina son más de dos veces superiores en presencia de hígado lesionado que frente a hígado sano, tanto a las 48 horas como a las 80 horas del inicio del cocultivo (Figura 47).

**5.2.2.- Diferenciación Pulmonar:** La diferenciación pulmonar de las células de la decidua se obtiene con tan sólo tres días de incubación en medio de diferenciación pulmonar. Dicha diferenciación se pone en evidencia por el cambio en la morfología de

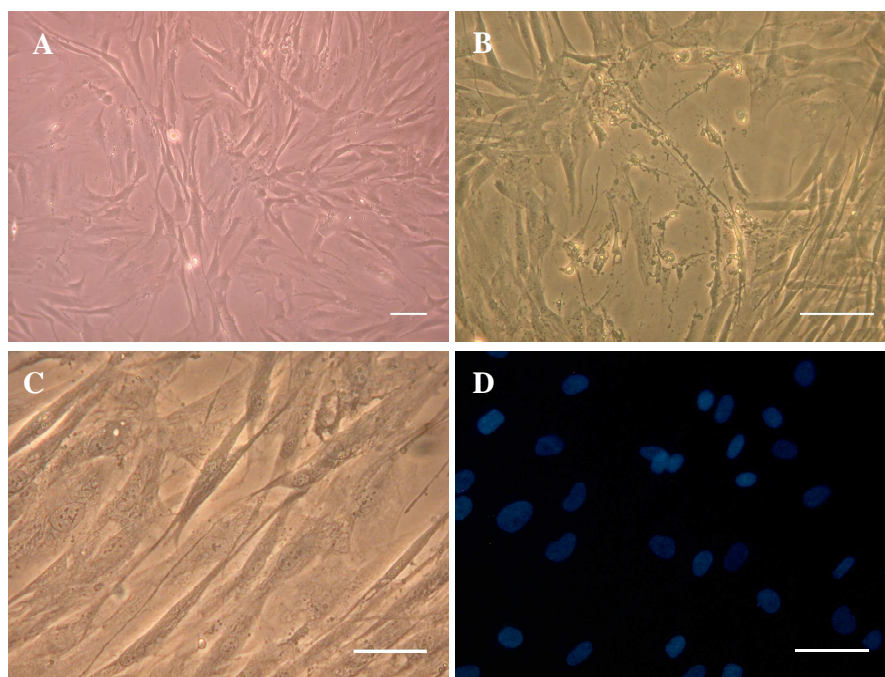


**Figura 48.- Diferenciación pulmonar de las células tipo mesenquimal derivadas de la decidua.** (A) Células sin diferenciar. (B) Células después de tres días en medio de diferenciación. (C y D) Imagen ampliada de dos células donde se aprecian unas estructuras semejantes a los cuerpos lamelares (indicadas con flechas). Mediante inmunofluorescencia se muestra la expresión de la proteína surfactante B (E, verde) y de la proteína prosurfactante C (F, verde) en las células diferenciadas. (G) Proteína surfactante B (verde) y (H) proteína prosurfactante C (verde) en células sin diferenciar. Núcleos teñidos de azul con DAPI. Barras de escala: C y D = 50  $\mu\text{m}$ ; A, B, E, F, G y H = 200  $\mu\text{m}$ .



las células hacia una morfología epitelioide y la aparición de estructuras semejantes a los cuerpos lamelares en su interior (Figura 48 B-D). Los resultados indican un alto grado de diferenciación pulmonar de las células tipo mesenquimal del saco amniótico de la placenta. Las proteínas surfactantes B y C se producen en los alveolos, donde se encargan de mantener la tensión superficial. La presencia de estas dos proteínas en las células diferenciadas se pone de manifiesto mediante inmunocitoquímica (Figura 48 E y F). Estos marcadores no se expresan en las células tipo mesenquimal sin diferenciar (Figura 48 G y H). Estos resultados indican que las células de tipo mesenquimal obtenidas de la decidua de la placenta poseen la capacidad de diferenciarse *in vitro* a células alveolares tipo II.

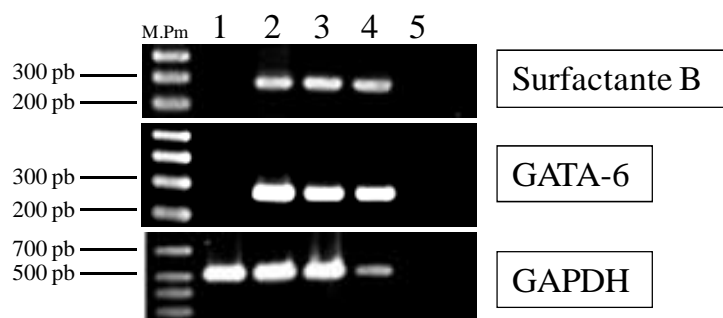
Los fibroblastos de piel adultos se cultivaron bajo las mismas condiciones de diferenciación, con el fin de ser utilizados como control negativo del proceso de diferenciación. A las 48 horas de iniciado el proceso de diferenciación se observó cierto grado de muerte celular en algunas zonas (Figura 49 B), aunque la mayoría de las



**Figura 49.- Fibroblastos adultos de piel cultivados en medio de diferenciación pulmonar.** (A) Células sin diferenciar. (B) Células en medio de diferenciación donde se observa que empiezan a aparecer zonas con muerte celular. (C) Células con aspecto saludable al final de la diferenciación, (D) Células teñidas mediante inmunofluorescencia para la proteína prosurfactante C en verde. Núcleos en azul teñidos con DAPI. Las barras de escala corresponden a 200  $\mu\text{m}$ .

células parecen saludables y sin cambios acusados de morfología (Figura 49 C). Al tercer día en medio de diferenciación, mediante inmunocitoquímica se observó la ausencia de proteína prosurfactante C (Figura 49 D), indicando que estas células no se diferencian hacia células alveolares tipo II en las condiciones utilizadas.

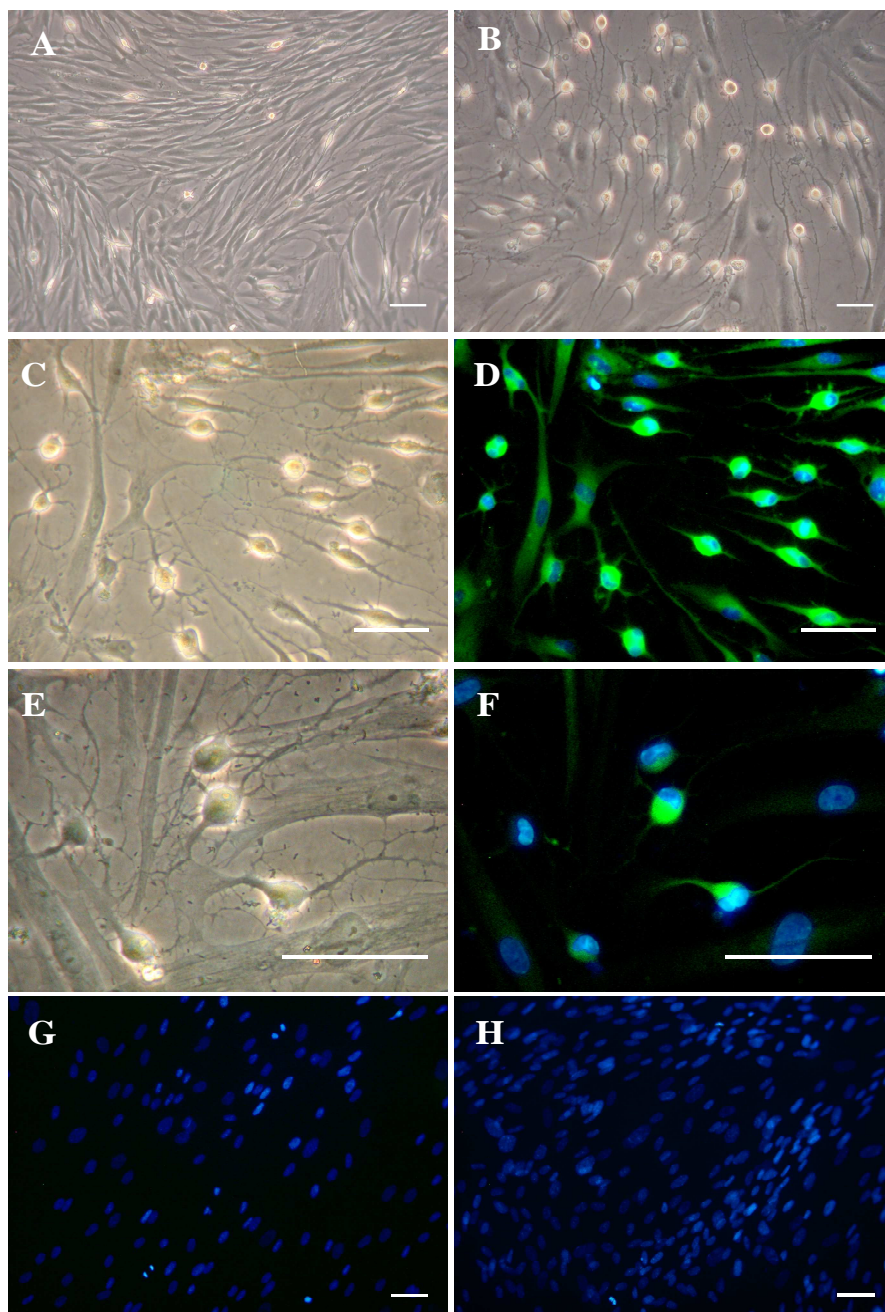
El análisis del ARN purificado de las células diferenciadas correspondientes a tres placentas diferentes muestra la expresión tanto del gen para la proteína surfactante B como de GATA-6, un factor de transcripción implicado en el desarrollo del pulmón. Estas proteínas no se expresan en las células sin diferenciar (Figura 50).



**Figura 50.- Análisis mediante RT-PCR de las células diferenciadas hacia el linaje pulmonar.** Línea 1: células sin diferenciar; líneas 2-4: células diferenciadas procedentes de tres placentas diferentes sometidas a diferenciación pulmonar; línea 5: control negativo. Como control de la RT-PCR se ha utilizado el gen para GAPDH.

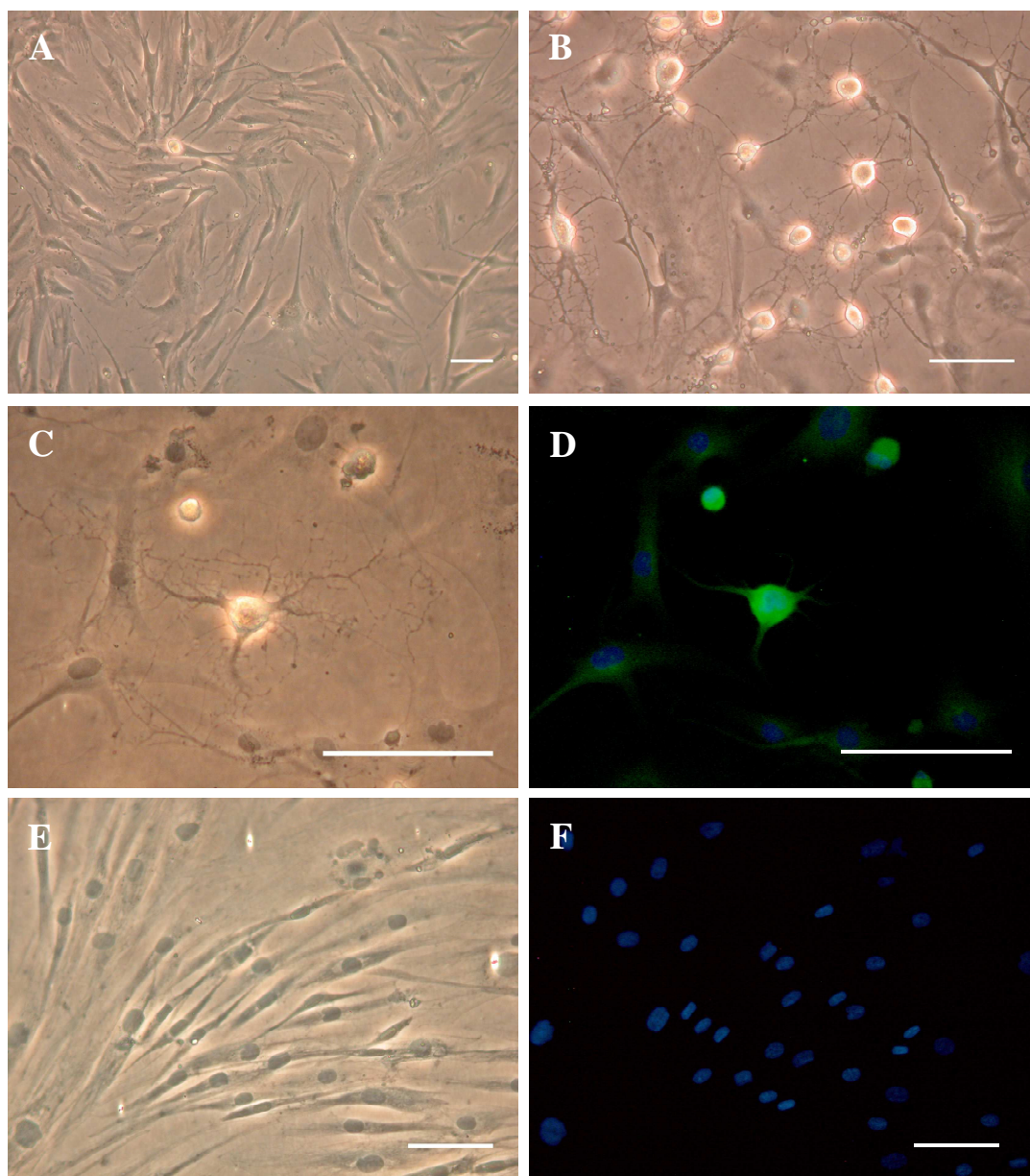
### 5.3.- Diferenciación hacia el linaje ectodérmico.

**5.3.1.- Diferenciación neural:** La diferenciación neural se obtuvo con tan solo 48 horas de cultivo en las condiciones descritas. La primera evidencia de diferenciación viene marcada por el acusado cambio de morfología de las células que adquieren una morfología típica de neuronas que consta de un cuerpo celular del que emergen prolongaciones diferentes en número y tamaño. Mediante inmunocitoquímica se puso de manifiesto la expresión de los marcadores neuronales,  $\beta$  III tubulina (Figura 51 D) y neurofilamento 200 (Figura 51 F), característicos de precursores de neuronas. Sin embargo, las células sin diferenciar son negativas para ambos marcadores neuronales. Los resultados indican que con este método de diferenciación se ha obtenido un cultivo compuesto por neuronas diferenciadas *in vitro* a partir de las células de tipo mesenquimal derivadas de la placenta humana.



**Figura 51.- Diferenciación neural de las células derivadas de la decidua humana.** (A) Células derivadas de la decidua humana sin diferenciar. (B) Las células después de la diferenciación adoptan la morfología típica neuronal. (C-D) Contraste fases y tinción mediante inmunocitoquímica para la proteína  $\beta$  III tubulina en verde. (E-F) Contraste de fases e inmunocitoquímica para la proteína neurofilamento 200 en verde. (G-H) Inmunofluorescencia para  $\beta$  III tubulina y neurofilamento 200 (ambos en verde) en células sin diferenciar. Núcleos teñidos en azul con DAPI. Las barras de escala representan 200  $\mu$ m.

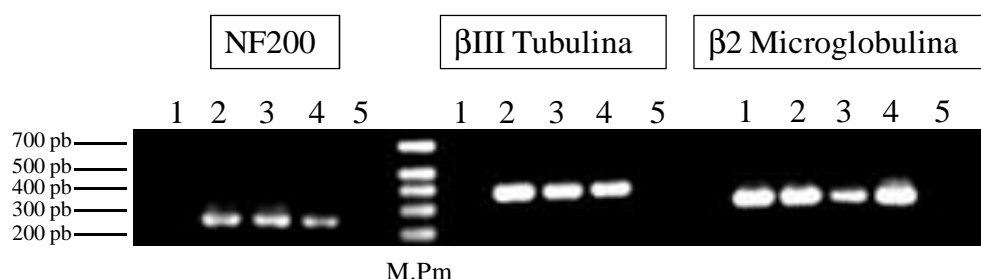




**Figura 52.- Diferenciación neural de fibroblastos de piel adultos.** (A) Células antes de la diferenciación neural. (B) Fibroblastos correspondientes al primer pase del cultivo a las 24 horas en medio de diferenciación neural muestran un acusado cambio de morfología. (C-D) Fibroblastos adultos correspondientes al primer pase del cultivo después de tres días en medio de diferenciación neural muestran expresión de  $\beta$  III tubulina teñida en verde mediante inmunocitoquímica. (E-F) Fibroblastos en pase ocho cultivados en medio de diferenciación neural durante tres días no presentan ni cambio morfológico ni la expresión de  $\beta$  III tubulina mediante inmunocitoquímica. Núcleos teñidos en azul con DAPI. Las barras de escala representan 200  $\mu$ m.

El mismo protocolo de diferenciación neural se utilizó en fibroblastos de piel humana. Los fibroblastos en los primeros pases del cultivo presentaron un cierto grado de diferenciación neural, evidenciado por el cambio morfológico y la expresión de la proteína  $\beta$  III tubulina. Sin embargo, esta capacidad se pierde con el transcurso de los pases. Así, en el pase ocho y con el mismo procedimiento de diferenciación, no se observó ningún cambio morfológico ni la expresión de  $\beta$  III tubulina (Figura 52).

El análisis del ARN purificado de las células diferenciadas confirma la diferenciación por la expresión tanto de la  $\beta$  III tubulina como del neurofilamento 200 (Figura 53). Las células sin diferenciar no expresan ninguno de estos dos marcadores cuando se analizan mediante inmunocitoquímica y RT-PCR (Figura 53 y 51 G y H).

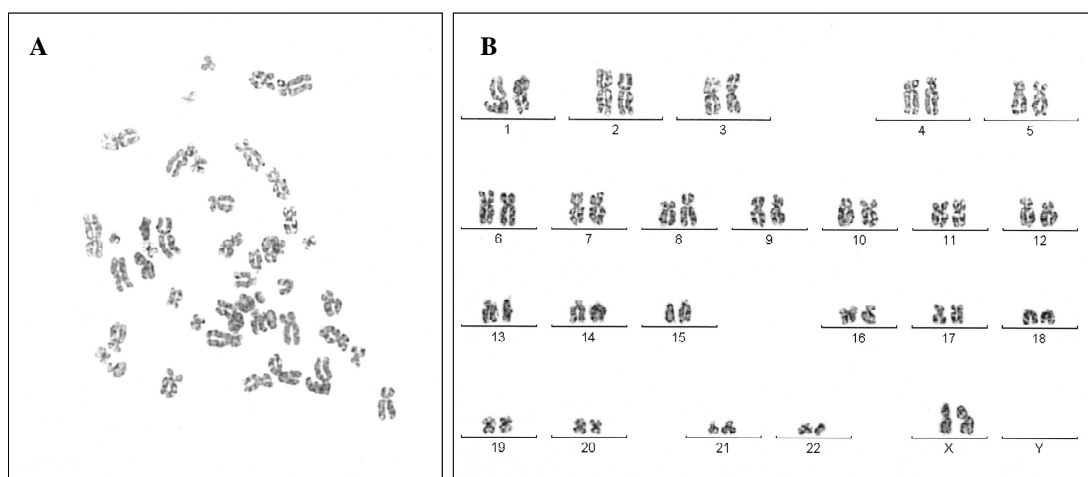


**Figura 53.- Análisis del ARN purificado a partir de las células derivadas del saco amniótico.** Línea 1: Células sin diferenciar; Líneas 2-4: Células de tres placentas diferentes diferenciadas hacia el linaje neural; Línea 5: Control negativo de la RT-PCR. Como gen control se ha utilizado la expresión  $\beta$ 2-microglobulina.

## 6.- Determinación de la estabilidad genómica. Análisis del Cariotipo.

La posible utilidad a nivel clínico de una población de células madre, depende, al menos en parte, de su capacidad de expansión sin sufrir diferenciación espontánea, pero también de que presenten un cariotipo estable durante todo el proceso de cultivo. Debido a esto, se realizó el estudio del cariotipo mediante la tinción de bandas G cromosómicas en extendidos de metafases de las células de la decidua en los últimos pases del cultivo.

Los resultados obtenidos muestran un cariotipo normal compuesto por 22 pares de cromosomas somáticos más el par sexual (Figura 54). En todos los casos analizados ( $n=3$ ), el cariotipo mostró ser 46 XX sin la presencia visible de aneuploidías ni de otras anomalías evidentes. Estos datos sugieren, por tanto, que las células derivadas de la decidua son capaces de expandirse en cultivo sin cambios aparentes en su cariotipo, indicando que, al menos al nivel cromosómico, no parece que sean capaces de originar procesos mutagénicos.



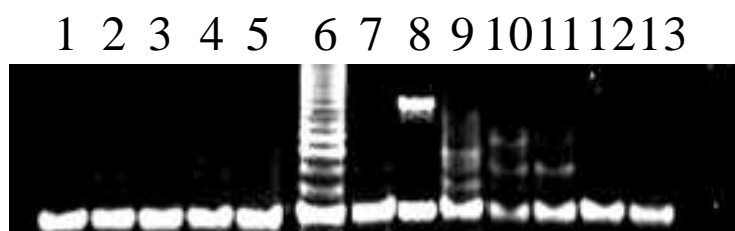
**Figura 54.- Ejemplo representativo de una extensión metafásica obtenida a partir de células derivadas del saco amniótico.** Las células analizadas corresponden al pase 20 de un cultivo que alcanzó 22 pases. (A) Placa metafásica extendida. (B) Cariotipo normal en el que los cromosomas se han ordenado mediante el programa informático Ikaros.

## 7.- Determinación de la actividad telomerasa.

Para que una población de células madre pueda usarse en el futuro en tratamientos de terapia celular es necesario estudiar dos factores importantes y directamente relacionados que son la estabilidad replicativa y la senescencia. La estabilidad replicativa de la célula adulta está garantizada por las repeticiones teloméricas que otorgan protección a los extremos de los cromosomas. La ADN polimerasa no puede replicar completamente estas secuencias repetidas dando lugar a un acortamiento progresivo de los telómeros durante las sucesivas divisiones celulares. El desgaste del telómero marca el límite de las divisiones celulares y las células alcanzan la

senescencia. Este número finito de divisiones celulares depende de la longitud de los telómeros de la población celular de partida (Guillot y col., 2007). Las células embrionarias no presentan este acortamiento telomérico después de cada división debido a que presentan elevados niveles de actividad telomerasa. La telomerasa es una enzima ribonucleasa que añade las repeticiones teloméricas al final de los cromosomas manteniendo así la longitud de los telómeros y jugando un papel muy importante en el mantenimiento de la actividad replicativa de una célula (Thomson y col., 1998). Las células madre embrionarias escapan de esta forma de la senescencia y son capaces de dividirse de forma indefinida. Esta capacidad de división indefinida hace a las células embrionarias muy atractivas desde el punto de vista de estudios *in vitro*. Sin embargo, en estudios de trasplantes *in vivo* se ha visto que estas células generan teratomas o teratocarcinomas debido a esa capacidad de proliferación indefinida, una de las características más típicas de las células cancerígenas (Czyz y col., 2003).

Las células tipo mesenquimal derivadas de la placenta humana presentan un número finito de divisiones celulares (Figura 16), por lo que, decidimos estudiar si este hecho es debido a la ausencia de actividad telomerasa en las mismas. El ensayo de actividad telomerasa en las células de tipo mesenquimal de la decidua se puso de manifiesto mediante el análisis de las repeticiones teloméricas. Los resultados muestran que las células presentan actividad telomerasa en los pases iniciales del cultivo y que dicha actividad descende progresivamente hasta hacerse inapreciable a partir del decimotercer pase en un cultivo que alcanzó un número total de 18 pases. Este descenso

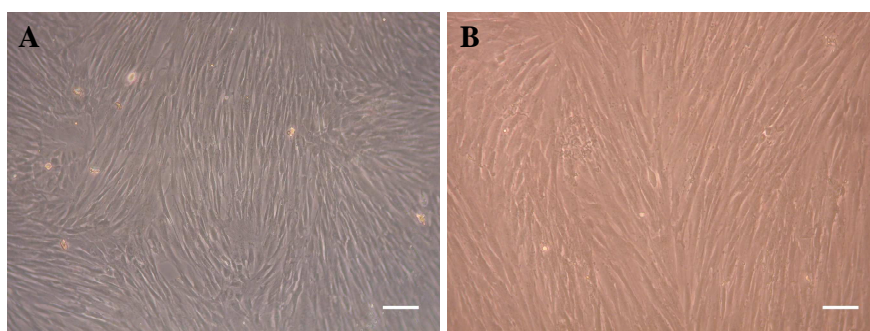


**Figura 55.- Ensayo de actividad telomerasa.** En la figura se muestra el análisis de las repeticiones teloméricas de células correspondientes a pases sucesivos de un mismo cultivo. Líneas 1-5: extractos celulares de pase 1, 5, 10, 13 y 16, respectivamente, inactivados por calor; línea 6: control positivo de células con elevada actividad telomerasa; línea 7: control negativo de contaminación de la PCR; Línea 8: marcador de peso molecular; las bandas corresponden a 50 pb y 100 pb; líneas 9-13: extractos de pase 1, 5, 10, 13 y 16, respectivamente, obtenidos de células de la decidua.

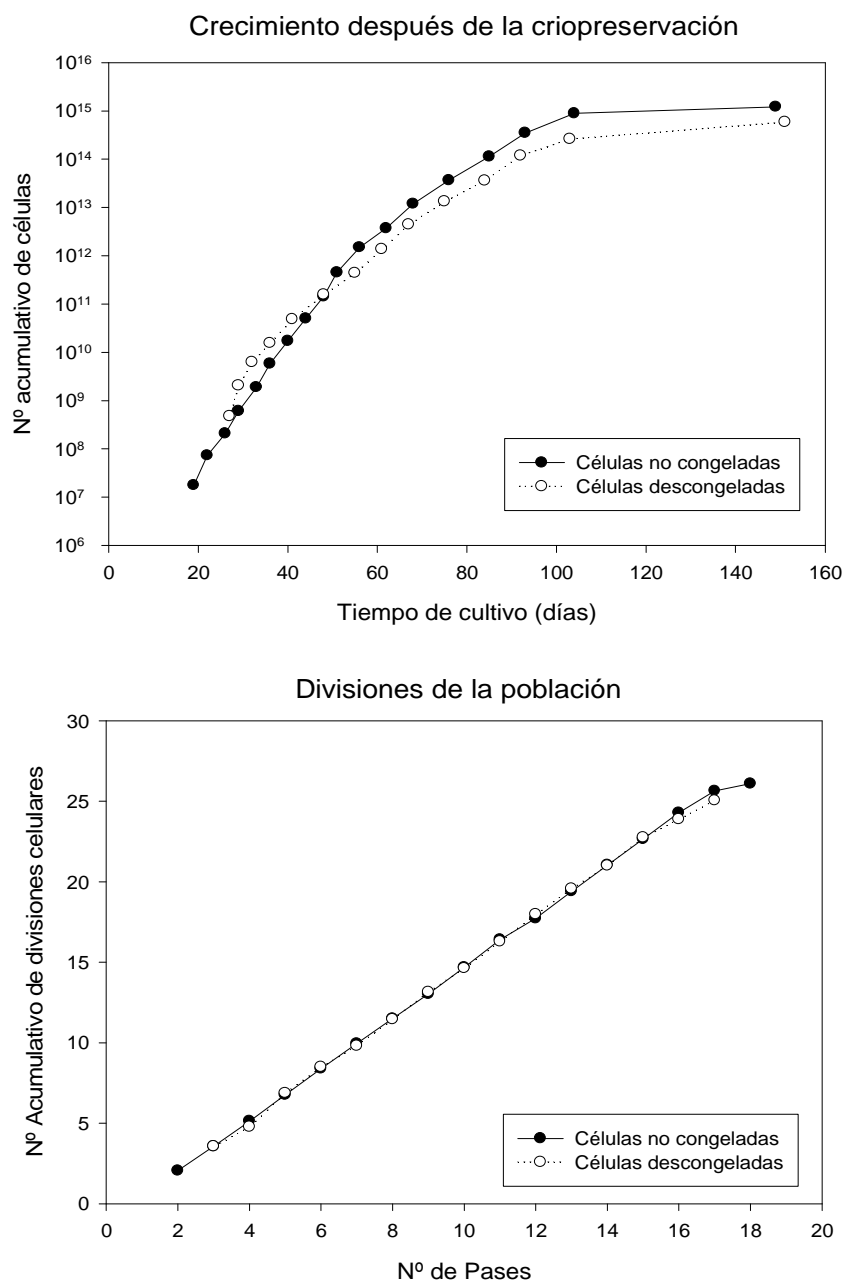
gradual en la actividad telomerasa de las células está en concordancia con el hecho de que éstas presenten un número limitado de divisiones celulares alcanzándose la senescencia celular (Figura 55). Estos datos indican que las células mesenquimales obtenidas de la decidua presentan una serie ventajas sobre las células madre embrionarias en futuros estudios *in vivo*, pues es posible que estas células no presenten capacidad tumorigénica una vez trasplantadas. Estos estudios se realizarán en un futuro en nuestro laboratorio.

#### **8.- Determinación de la cinética de crecimiento tras el almacenaje mediante criopreservación.**

En la actualidad, existen procedimientos que permiten almacenar las células en nitrógeno líquido hasta su uso pero es necesario conocer cómo estos procedimientos de criopreservación pueden afectar a la viabilidad y supervivencia de las células descongeladas. Por ello, decidimos estudiar el comportamiento en cultivo de las células derivadas de la placenta humana después de su criopreservación. Para ello se compararon las cinéticas de crecimiento de las células provenientes de la misma placenta sin y con proceso previo de congelación. Las células se congelaron en pase tres y fueron descongeladas después de tres meses de almacenamiento en nitrógeno líquido. Mediante microscopía óptica, se observó en primer lugar que las células no se vieron afectadas por la criopreservación desde el punto de vista morfológico, manteniéndose la forma de fibroblasto una vez descongeladas (Figura 56).



**Figura 56.- Morfología celular después de la criopreservación.** (A) Morfología de las células después de su aislamiento. (B) Morfología de las mismas células después de haberse mantenido criopreservadas durante varios meses. Las barras de escala corresponden a 200  $\mu\text{m}$ .



**Figura 57.- Comparación de las curvas de crecimiento de un cultivo antes y después de la criopreservación.** (A) Durante el periodo de cultivo ambas poblaciones mantienen una dinámica exponencial. Las células no congeladas generaron una población de  $1,21 \times 10^{15}$  células. Las células descongeladas generaron una población de  $5,87 \times 10^{14}$  células. (B) El número total de divisiones celulares no se ve afectado por el periodo de criopreservación.

Se compararon las cinéticas de las dos poblaciones a lo largo de los diferentes pases. El cultivo no congelado muestra una dinámica de población claramente exponencial (Figura 57). Las células se dividieron 26,09 veces con respecto a la población original durante 18 pases en un tiempo de cultivo de 149 días con un tiempo de generación medio de 5,31 días en los pases del 2 al 17. En el caso del cultivo descongelado la dinámica de crecimiento es también de tipo exponencial. Las células se mantuvieron en cultivo durante un periodo de 151 días en los cuales suceden 17 pases y 25,05 divisiones de la población original, con un tiempo de generación medio de 5,92 días en los pases del 2 al 16 (Figura 57). Todos los cálculos se han realizado, teniendo en cuenta que en el momento de la descongelación las células ya habían sido sometidas a tres pases y a un periodo de cultivo de 26 días.

#### **9.- Determinación de la capacidad de transfección mediante la técnica de nucleofección.**

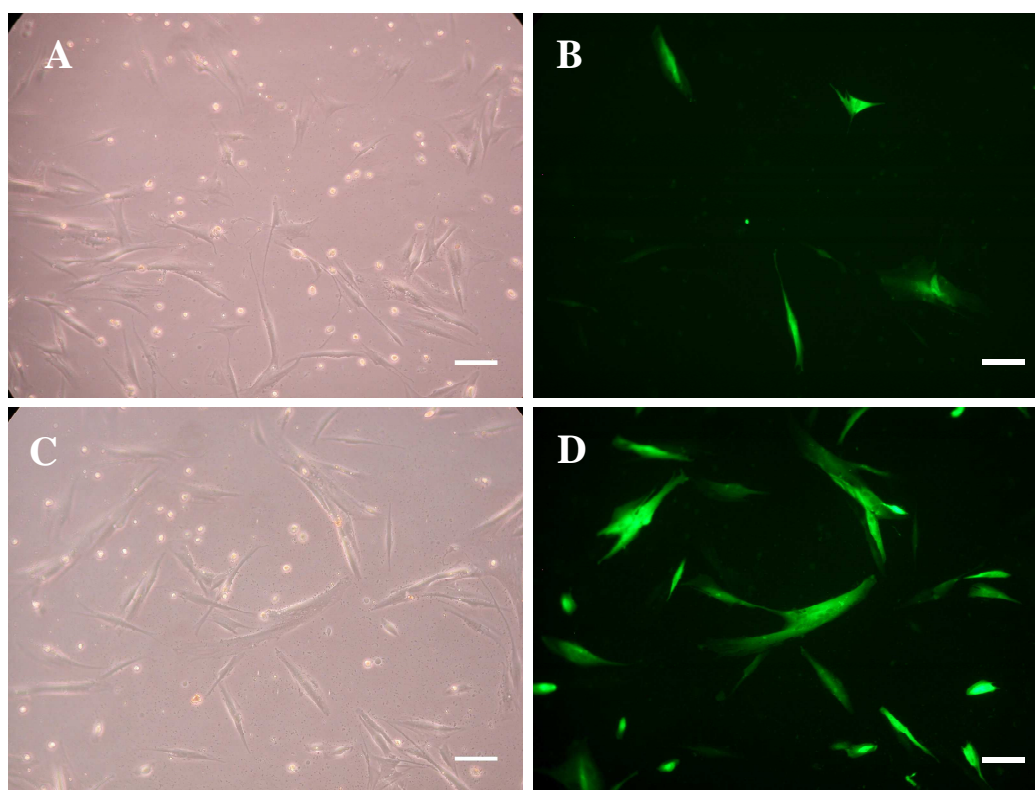
Las células madre se pueden usar para reparar genes defectuosos o como vehículos celulares para el transporte de agente terapéuticos usando la transferencia genética. Hasta la fecha, para la introducción de genes en células primarias se han utilizado principalmente técnicas basadas en virus. Estas técnicas presentan una ventaja frente a las técnicas no virales, como por ejemplo la lipofección, puesto que proporcionan una alta eficiencia. Sin embargo, presentan una serie de desventajas como la activación de la respuesta inmune y la posibilidad de provocar alteraciones genéticas en la célula portadora a causa de la integración del ADN viral que en un futuro pueden dar lugar a la aparición de tumores.

La tecnología de la nucleofección es una nueva técnica no basada en virus y especialmente diseñada para células primarias. Esta técnica combina parámetros eléctricos con disoluciones específicas para cada tipo celular con el fin de introducir plásmidos de ADN en el interior del núcleo celular. En células mesenquimales de médula ósea la nucleofección consiguió un 80% de eficiencia en la transferencia génica sin afectar la capacidad de diferenciación de las mismas ni al inmunofenotipo de las células (Aluigi y col., 2006). Dada la naturaleza mesenquimal de las células obtenidas de la placenta decidimos estudiar si eran susceptibles de ser transfectadas mediante la



técnica de la nucleofección usando la solución específica para la transfección de las células mesenquimales de médula ósea.

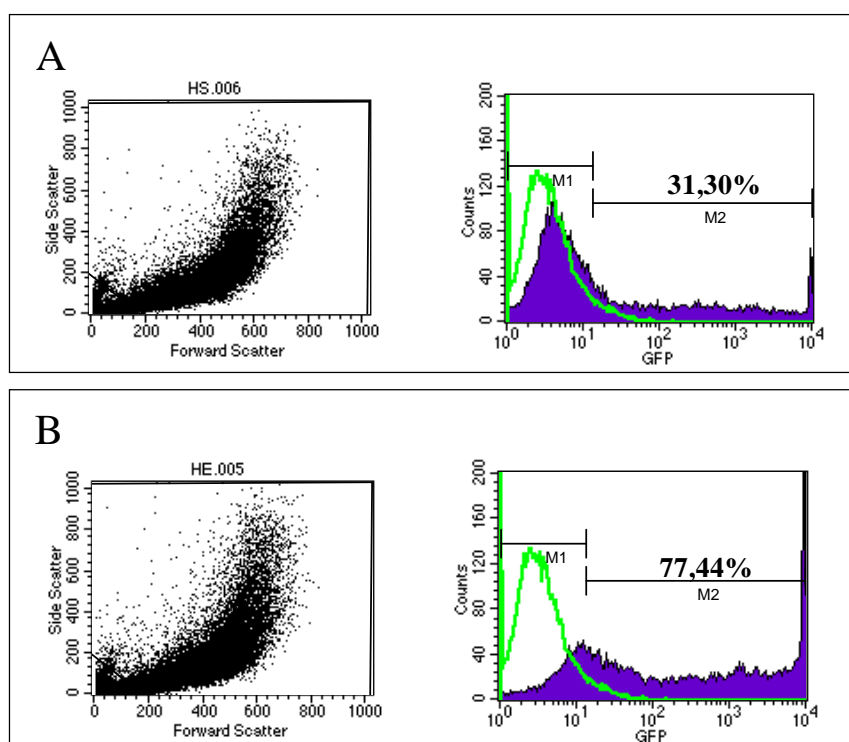
Las células de tipo mesenquimal pueden transfectarse usando dos tipos de programas, uno con alta eficiencia y otro con alta supervivencia. En primer lugar, se realizó un estudio comparativo entre estos dos programas de nucleofección con el fin de determinar el más adecuado para las células obtenidas de la decidua. Después de 24 horas de realizar el procedimiento, las células se observaron bajo microscopía de fluorescencia y los resultados obtenidos muestran una diferencia importante en la eficiencia de la nucleofección entre ambos programas (Figura 58). Mediante el recuento de las células no adherentes se determinó la tasa de muerte celular que produce el procedimiento de nucleofección.



**Figura 58.- Células derivadas de la decidua nucleofectadas con un vector que expresa GFP. (A-B) Células nucleofectadas usando el programa de alta supervivencia vistas bajo contraste de fases y microscopía de fluorescencia, respectivamente. (C-D) Células nucleofectadas con el programa de alta eficiencia en contraste de fases y fluorescencia, respectivamente. Barras de escala correspondientes a 200  $\mu$ m.**



La eficiencia de nucleofección se evaluó mediante citometría de flujo como el porcentaje de células que expresan la proteína verde fluorescente GFP en cada población celular resultante de ambos procedimientos de transferencia genética (Figura 59). El programa de alta supervivencia proporcionó una tasa de nucleofección del 31,30%, con una tasa de muerte celular del 20,8%. El programa de alta eficiencia alcanzó una la tasa de nucleofección del 77,44% con una tasa de muerte celular del 16%. Podemos concluir, por tanto, que el programa de alta eficiencia es el más adecuado para la nucleofección de las células tipo mesenquimal derivadas del saco amniótico de la placenta humana.



**Figura 59.- Análisis de la eficiencia de la nucleofección mediante citometría de flujo.**

(A) Ejemplo de transfección usando el programa de alta supervivencia. El porcentaje de células que expresan la proteína GFP es del 31,30 %. (B) Ejemplo de transfección usando el programa de alta eficiencia. Como puede observarse un 77,44% de células son positivas para GFP.

En estudios posteriores, se utilizó el programa de alta eficiencia para transfectar células procedentes de tres placentas diferentes. Los resultados obtenidos mediante el análisis por citometría de flujo mostraron que las células de la decidua se transfectaron con una

eficiencia del  $89,48 \pm 8,01$  % con una tasa de muerte celular del  $16,67 \pm 2,95$  % (calculada por recuento de células no adherentes).

En resumen podemos concluir que, las células de tipo mesenquimal derivadas del saco amniótico de la placenta humana presentan la capacidad de ser transfectadas usando la tecnología de nucleofección con una alta eficiencia (mayor del 85%) y una supervivencia celular superior al 80%.

## VI. DISCUSIÓN.



El campo del estudio y comprensión de la biología de las células madre se ha desarrollado de forma importante en los últimos años, debido a que estas células son capaces de proliferar y diferenciarse a un gran número de células especializadas, por lo que pueden tener un gran impacto en el desarrollo de la medicina del futuro. Se ha propuesto que las células madre embrionarias podrían utilizarse en medicina regenerativa debido a su capacidad de diferenciarse hacia los doscientos tipos de células especializadas de un organismo adulto. Sin embargo, su método de obtención genera una serie de cuestiones bioéticas. Los trabajos con células madre embrionarias son muy recientes y en humanos se remontan sólo a 1998 (Thomson y col., 1998). Sin embargo, el estudio de la biología de las células madre adultas posee una mayor trayectoria histórica, debido a la utilización de la médula ósea como fuente de células madre para trasplante desde hace más de cincuenta años. Las células madre adultas más estudiadas han sido las células madre hematopoyéticas y las células madre mesenquimales (Cairo y Wagner, 1997 y Colter y col., 2000). Las células madre hematopoyéticas que están presentes en número bajo en la médula ósea, en sangre periférica y en la sangre del cordón umbilical tienen una alta capacidad de regeneración tisular una vez trasplantadas (Cairo y Wagner, 1997 y Bonnet, 2003). Sin embargo, su principal inconveniente radica en que son difíciles de expandir *in vitro*. Concretamente, en el caso de la sangre de cordón umbilical, es necesario el cocultivo con células mesenquimales para conseguir su expansión, lo que es particularmente importante debido al número limitado de células madre hematopoyéticas que se obtiene de cada cordón (Broxmeyer y col., 1989; Koller y col., 1998; Zhang y col., 2004; Bornstein y col., 2005).

Las células mesenquimales están presentes en varios de los tejidos del cuerpo humano, como por ejemplo, la médula ósea, el riñón, los pulmones y el hígado. Hasta el momento, la médula ósea es la fuente principal de obtención de células madre mesenquimales, pero estas células comprenden sólo el 0,01-0,0001% del total de las células nucleadas del tejido (Miao y col., 2006). A pesar de su bajo número, las células madre mesenquimales presentan la ventaja de que son mucho más fáciles de expandir en cultivo que las células madre hematopoyéticas, manteniendo sus características de células progenitoras durante su expansión sin sufrir diferenciación espontánea y con una gran capacidad de diferenciación hacia múltiples tejidos (Minguell y col., 2000). El principal inconveniente que presentan es que su obtención se lleva a cabo mediante biopsia, lo que supone un alto riesgo para el donante.

Varios grupos de investigación han señalado a la placenta humana como una fuente alternativa de células madre (In 't Anker y col., 2004; Igura y col., 2004; Fukuchi y col., 2004; Miki y col., 2005; Yen y col., 2005 y Chien y col., 2006). Esto es así, porque este tejido consigue eliminar el principal inconveniente que los estudios de células madre habían encontrado: el riesgo para el donante al tratarse de un tejido que se desecha tras el parto. Recientemente, se han publicado estudios en los que se demuestra que el líquido amniótico puede ser una fuente alternativa de células madre (Bossolasco y col., 2006; De Coppi y col., 2007 y Kim y col., 2007). Las células obtenidas de esta fuente son fáciles de mantener en cultivo y presentan también una elevada multipotencialidad. Sin embargo, su principal inconveniente radica en que el método de obtención de las mismas, mediante amniocentesis, conlleva un riesgo de aborto.

Mediante el uso de metodologías de disección y digestión enzimática similares a los utilizados por otros grupos, nosotros hemos obtenido unas células de tipo mesenquimal a partir de la placenta a término. La mayoría de los grupos de investigación que han explorado la placenta en busca de células madre han obtenido distintas poblaciones, en su mayoría de origen fetal (Fukuchi y col., 2004; Igura y col., 2004; Miki y col., 2005; Portmann-Lanz y col., 2006 y Soncini y col., 2007). Sin embargo, el análisis citogenético realizado en las células obtenidas en nuestro laboratorio en tres poblaciones de células derivadas de placentas de varón, mostraron que las células obtenidas por nuestro grupo son de origen materno y, por tanto, derivadas de la decidua humana. Otros grupos de investigación ya han descrito la presencia de diferentes poblaciones de células con características de células madre en la decidua humana (In 't Anker y col., 2004; Barlow y col., 2008; Strakova y col., 2008; Huang y col., 2009; Dimitrov y col., 2010 y Semenov y col., 2010). Por tanto, a partir de la placenta humana se pueden obtener tanto células de origen fetal como células de origen materno. Este hecho convierte a la placenta en un recurso altamente atractivo y cuyo potencial aún se está empezando a explorar.

Desde el punto de vista del comportamiento en cultivo de las células aisladas en nuestro grupo el cultivo inicial está compuesto por una población heterogénea de células, pero sólo la población con morfología de fibroblasto permanece después de las primeras tripsinizaciones y pases. Estas células con morfología de fibroblasto son capaces de expandirse, manteniendo su cariotipo estable y sin sufrir diferenciación espontánea

durante el proceso. El análisis de su fenotipo indica que son células de tipo mesenquimal con una dinámica de crecimiento exponencial similar a la de las células mesenquimales obtenidas de médula ósea, aunque su capacidad de expansión es superior (Miao y col., 2006 y Colter y col., 2000). En el cultivo inicial se obtiene un elevado número de células adherentes al plástico que junto con su capacidad de expansión *in vitro* apunta a la posibilidad de obtención de un número suficiente de células para su uso clínico en el futuro (Deans y Mosely, 2000).

El problema que presentan las células madre mesenquimales es que no tienen un marcador específico que permita aislarlas e identificarlas fácilmente. Diversos estudios han definido el fenotipo de las células madre mesenquimales como negativas para CD45, CD34 y CD133 y positivas para marcadores como CD44, CD73, CD105 y CD90 (Chamberlain y col., 2007). Sin embargo, la obtención de células con características de células mesenquimales de diversos tejidos, ha llevado al establecimiento de unos criterios mínimos que una población celular debe cumplir para ser considerada como células madre mesenquimales (Dominici y col., 2006). Desde el punto de vista de la expresión de antígenos de membrana las células deben ser negativas para CD45 y CD34 y deben ser positivas para CD90, CD105 y CD73. Las células obtenidas en nuestro laboratorio son claramente positivas para los antígenos CD73, CD90, CD133, CD44, CD105, CD117 y CD29 y negativas para los marcadores de las células madre hematopoyéticas CD45, CD34, CD133 y BCRP1. Podemos, por tanto concluir, que las células obtenidas en nuestro laboratorio son células de tipo mesenquimal, dado que cumplen los requisitos establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (Dominici y col., 2006). Este fenotipo es estable durante todo el periodo de cultivo.

Algunos autores han mostrado que las células de tipo mesenquimal derivadas de la membrana amniótica (Miki y col., 2005), del líquido amniótico (Kim y col., 2007), e incluso de la decidua basalis (Huang y col., 2009) expresan una serie de marcadores característicos de las células madre embrionarias: SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 y TRA-1-81. Sin embargo, las células derivadas de la decidua humana obtenidas en nuestro laboratorio no expresan de ninguno de estos antígenos en su superficie, lo cual se asemeja a las células derivadas de la médula ósea adulta (Yen y col., 2008) y otra población celular también obtenida a partir de la decidua basalis (Barlow y col., 2008). Algunos estudios han demostrado la expresión de estos antígenos de membrana en

células mesenquimales aisladas de diversos tejidos fetales como el hígado, la sangre y la médula ósea aunque posteriormente, no se encontraron en la médula ósea adulta (Guillot y col., 2007). Por tanto, la presencia de estos marcadores en las células madre derivadas de las diferentes partes de la placenta podría tomarse, bien como indicativo de su origen fetal o bien como indicativo de un estadio muy primitivo en estas células. Las células derivadas de la decidua presentadas en este trabajo, sin embargo, parecen ser una población celular más madura, desde el punto de vista de su desarrollo ya que no expresan ninguno de estos marcadores embrionarios, pero que sin embargo, mantiene una elevada plasticidad.

Las células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea poseen una serie de ventajas que las hacen muy atractivas para su uso en medicina regenerativa. Por un lado, está el hecho de que no producen la reacción de reconocimiento inmune de las células del donante frente a los tejidos y células del receptor. Esto es debido a que estas células no expresan antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II en su superficie ni una serie de moléculas necesarias para que se produzca la alorreactividad como son CD40 y las coestimuladoras CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2). Por otro lado, las células mesenquimales disminuyen la respuesta mitogénica de los linfocitos T cultivados en presencia de mitógenos. Esta capacidad inmunosupresora de las células mesenquimales las cualifica como moduladores naturales de la respuesta inmune para su uso en terapias de trasplante celular en el tratamiento de enfermedades autoinmunes y de rechazo del injerto (Deans y Mosely, 2000; El-Badri y col. 2004 y Zhao y col., 2004). Las células obtenidas en nuestro laboratorio al igual que las mesenquimales de médula expresan en su superficie moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I, pero no expresan las de clase II. Además, también carecen de expresión de las moléculas coestimuladoras CD40, CD80 y CD86. Tomando en conjunto estos resultados, podemos sugerir que las células de tipo mesenquimal derivadas de la decidua humana obtenidas en nuestro laboratorio no van a generar una elevada respuesta inmune. A pesar de que las células mesenquimales de médula ósea no expresan el CMH de clase II en su superficie, un estudio demostró la presencia de depósitos intracelulares de estas proteínas mediante la técnica de Western Blot (Le Blanc y col., 2003). Posteriormente, este grupo demostró que la expresión de estas moléculas en la superficie de las células mesenquimales podía inducirse con el tratamiento con interferón- $\gamma$  (Le Blanc y Ringdén, 2005). No obstante, el tratamiento



con interferón- $\gamma$  no modifica la expresión de las moléculas coestimuladoras, por lo que en cocultivo no se produce respuesta proliferativa de los linfocitos T alorreactivos (Klyushnenkova y col., 2005). En las células caracterizadas en este trabajo no se detecta transcrito activo para los genes del complejo mayor de histocompatibilidad clase II mediante el análisis del ARN purificado. Estos datos son indicativos de la carencia, por parte de estas células, de ARN mensajero para estos genes, por lo que los depósitos intracelulares de proteína observados en las células de médula ósea adulta no podrían haberse formado en las células derivadas de la decidua. No obstante, sería interesante estudiar en un futuro si la expresión del CMH II podría inducirse bajo diferentes condiciones.

Las características inmunogénicas de las células madre mesenquimales de la médula ósea hacen que sean muy útiles para el tratamiento de la enfermedad injerto contra huésped después del trasplante de células madre alogénico (Mosca y col., 2000 y Frassoni y col., 2002). Estas observaciones preliminares, confieren valor a las células madre mesenquimales para su uso en trasplantes de órganos sólidos y enfermedades autoinmunes. Además, las células madre mesenquimales genéticamente modificadas pueden usarse como vehículos celulares de agentes biológicos, aprovechando la capacidad que poseen estas células de migrar e injertar en los lugares donde se ha sufrido una lesión. En el presente trabajo, se ha empleado un sistema novedoso no viral, la nucleofección, para introducir genes exógenos en las células derivadas de la decidua. La nucleofección es un sistema diseñado especialmente para la introducción de genes exógenos en células primarias y en líneas celulares difíciles de transfectar. Estudios recientes han mostrado una elevada tasa de nucleofección en células embrionarias (Hohenstein y col., 2008), células madre adultas del sistema nervioso (Dieterlen y col., 2009) y neuronas maduras (Zeitelhofer y col., 2007). Este método ha sido utilizado también con éxito en células madre mesenquimales de médula ósea (Aluigi y col., 2006). Mediante esta técnica, nosotros hemos obtenido una elevada expresión de un gen exógeno dentro de las células obtenidas en nuestro laboratorio con una tasa de nucleofección y de muerte celular superiores a los obtenidos con células mesenquimales de médula ósea (Aluigi y col., 2006) y que además no se ve afectada por la criopreservación de las células. Por lo tanto la nucleofección es una técnica no viral que permite la introducción de genes exógenos en las células obtenidas en nuestro

laboratorio de forma eficiente, por lo que podrían usarse como vehículos celulares de agentes biológicos en procedimientos de trasplante celular y terapia génica.

Otro dato importante sobre las células obtenidas en nuestro laboratorio, lo aportan los experimentos de criopreservación. Estas células no ven modificado su comportamiento en cultivo, desde el punto de vista de su capacidad replicativa y de diferenciación después de mantenerse congeladas en nitrógeno líquido, como demuestra el hecho de que casi la totalidad de los experimentos que permitieron confirmar la expresión de los genes característicos de cada tejido, se han realizado con células previamente congeladas en nitrógeno líquido durante varias semanas o meses. Estos datos sugieren que si se confirma que las células de tipo mesenquimal derivadas de la decidua humana tienen una utilidad clínica, éstas podrían almacenarse en un futuro en bancos para un posterior uso en trasplantes tanto autólogos como alogénicos, al igual que en la actualidad sucede con las células madre hematopoyéticas de la sangre de cordón umbilical.

Las células caracterizadas en este trabajo, presentan un número de divisiones finito, es decir, las células alcanzan la senescencia o inestabilidad replicativa. Este número de divisiones finito viene marcado por el estado del cultivo inicial y por la pérdida de actividad telomerasa durante su cultivo (Guillot y col., 2007). Las células de la decidua aisladas por nosotros presentan una baja actividad telomerasa en los primeros pases del cultivo que se hace inapreciable en los últimos pases. Este comportamiento es similar al observado en otros tipos de células madre obtenidos de otras partes de la placenta (Fukuchi y col., 2004; Igura K y col., 2004; Portmann-Lanz y col., 2006; Soncini y col., 2007; Tamagawa y col., 2007; Barlow y col., 2008; Dimitrov y col., 2010 y Semenov y col., 2010). Sin embargo, las células madre embrionarias son capaces de dividirse en cultivo de forma indefinida, es decir, mantienen de forma constante su estabilidad replicativa debido a que presentan una elevada actividad telomerasa. Esta capacidad hace a las células embrionarias tomar ventaja sobre las adultas en estudios *in vitro*, pero en estudios *in vivo*, las células madre embrionarias son capaces de producir tumores en el receptor (Thomson y col., 1998) por esta capacidad de división indefinida, que es también una de las características más típicas de las células cancerígenas (Czyz y col., 2003). La capacidad de división finita de las células derivadas de la decidua junto con la

característica de que mantienen su cariotipo estable durante todo el proceso de cultivo hace pensar que estas células no van a poseer un elevado potencial tumorigénico *in vivo*.

Nuestro trabajo muestra la expresión del transcrito activo para los genes Oct-4, Rex-1 y GATA-4 por parte de las células derivadas de la decidua. La expresión de estos tres factores, considerados embrionarios, muy pocas veces se ha descrito en células adultas (Moriscot y col., 2005). Diferentes estudios han mostrado la importancia de la expresión de Oct-4 para la generación de las tres láminas germinales (Niwa y col., 2000 y Niwa, 2001). Este factor de transcripción se expresa sólo en aquellas células embrionarias que pueden diferenciarse a las tres capas germinales y en el adulto, normalmente, se encuentra restringido a la línea germinal. Los procesos de regulación de la expresión de Oct-4 parecen ser críticos, de tal manera que tanto el aumento como la disminución de su expresión provocan, a su vez, la regulación de algunos genes diana como Rex-1. En células embrionarias, el nivel de expresión de Oct-4 debe de mantenerse dentro de un estrecho margen para que las células conserven su capacidad pluripotencial (Niwa y col., 2000). Rex-1 es un gen que codifica una proteína en dedo de zinc, capaz de unirse al ADN y regular su transcripción. El ARN mensajero de Rex-1 sólo se detecta en un número muy limitado de células y tejidos como en células embrionarias indiferenciadas, blastocistos tempranos, trofoectodermo y línea germinal, y en todas ellas se relaciona con el mantenimiento del estado indiferenciado (Ben-Shushan y col., 1998). Oct-4 activa o reprime la expresión del gen de Rex-1 por mecanismos altamente complejos, pero en todos los casos se ha relacionado estos procesos con el comienzo de la organogénesis en el embrión, dado que una reducción en la transcripción de Rex-1 desencadena el comienzo de la diferenciación celular (Ben-Shushan y col., 1998). GATA-4, por su parte, es un factor de transcripción que desempeña un papel fundamental en la diferenciación hacia los linajes endodérmico y mesodérmico, durante la organogénesis de muchos vertebrados (Yoshida-Koide y col., 2004). La expresión de GATA-4 podría ser determinante en la diferenciación de las células madre hacia tejidos adultos, como por ejemplo, corazón, epitelio intestinal, endodermo primitivo y gónadas (Gillio-Meina y col., 2003). La expresión conjunta de GATA-4 con Oct-4 y Rex-1 se ha descrito en células mesenquimales de médula ósea, pero sólo cuando las células se cultivan en condiciones especiales de baja densidad y bajo suero (Roche y col, 2007). Sin embargo, en las células derivadas de la decidua estos factores de transcripción se expresan conjuntamente bajo las condiciones estándar de cultivo utilizadas en nuestro

laboratorio. La expresión conjunta de estos tres marcadores podría estar relacionada con la plasticidad de las células y su capacidad de diferenciación hacia las tres capas germinales.

En este trabajo mostramos la elevada plasticidad de las células obtenidas de la placenta, así como la alta eficiencia a hora de generar *in vitro* células de naturaleza muy diversa como son la adiposa, ósea, cartilaginosa, muscular, cardíaca, pulmonar, hepato-pancreática y neural. Por tanto, las células derivadas de la decidua humana son capaces de diferenciarse hacia células provenientes de las tres capas embrionarias. Como control negativo de todas las diferenciaciones se han utilizado fibroblastos de piel adultos. Exceptuando la diferenciación neural, que se discutirá más adelante, estos fibroblastos no se diferenciaron a ninguno de los tejidos ensayados cuando se emplearon los mismos protocolos que con las células de la placenta. Estos datos demuestran que los resultados obtenidos de los procedimientos de diferenciación no son debidos a procesos artefactuales, confirmando por tanto, la validez de los experimentos.

El potencial de diferenciación que presentan las células derivadas de la decidua humana, es similar e incluso superior al de las células mesenquimales obtenidas de médula ósea (Colter y col., 2000 y Miao y col., 2006) y al de las células de tipo mesenquimal obtenidas de otras partes de la placenta humana (Fukuchi y col., 2004; Igura y col., 2004; Soncini y col., 2007; Barlow y col., 2008; Strakova y col., 2008 y Dimitrov y col., 2010). Las células obtenidas de la decidua humana presentan la capacidad de diferenciarse a las líneas mesodérmicas típicas como son la adiposa, ósea y cartilaginosa, cumpliendo así otro de los criterios mínimos establecidos para que una población sea considerada como mesenquimal (Dominici y col., 2006). Esta capacidad de diferenciación se pone de manifiesto por la expresión de marcadores específicos de cada tejido, tanto a nivel de proteína como de ARN. Aunque los procedimientos utilizados son muy variados, nuestros resultados fueron similares o superiores a los obtenidos con células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea (Chen y col., 2008) y células derivadas de las diferentes partes de la placenta (Fukuchi y col., 2004; Igura y col., 2004; Soncini y col., 2007; Barlow y col., 2008; Strakova y col., 2008; Huang y col., 2009; Dimitrov y col., 2010 y Semenov y col., 2010), en cuanto a la capacidad de diferenciarse hacia los linajes adipogénico, osteogénico y condrogénico *in vitro*.

Las células obtenidas en nuestro laboratorio presentan una alta capacidad de diferenciación adipogénica. Esta diferenciación no sucede de forma espontánea, lo que queda demostrado por la ausencia de vesículas lipídicas en las células sin diferenciar. El análisis del ARN purificado pone de manifiesto la presencia de transcritos para los genes que codifican para las proteínas AP4 y PPAR $\gamma$ 4 en las células diferenciadas que no existen en las células sin diferenciar. El gen AP4 codifica para una proteína de unión a ácidos grasos que se localiza en los adipocitos y el gen PPAR $\gamma$ 4 codifica para una proteína de la familia de los receptores de peroxisomas activados que participa en la diferenciación de las células de la grasa blanca. La expresión de transcritos activos de estos genes, junto con la presencia de vesículas lipídicas, demuestra la diferenciación de las células derivadas de la decidua hacia el linaje adipogénico. Con el mismo procedimiento de diferenciación se han conseguido resultados similares con células mesenquimales derivadas de las membranas amniótica y coriónica (Soncini y col., 2007), y con las células multipotenciales obtenidas a partir de sangre de cordón umbilical (BioE, Inc. Methods for directed differentiation of MLPC).

Las células derivadas de la decidua humana muestran una elevada capacidad de diferenciación hacia el linaje osteogénico, como demuestra la tinción de depósitos de calcio con alizarín red y la presencia de fosfatasa alcalina (teñida con SIGMA FAST) una de las enzimas responsables de la mineralización del hueso. Los resultados obtenidos son similares a los de las células mesenquimales derivadas del amnio y del corion (Soncini y col., 2007) y las células regenerativas derivadas del endometrio a través de la sangre menstrual (Meng y col., 2007). Mediante el análisis del ARN purificado se ha estudiado la presencia de transcritos activos para osteonectina y osteocalcina que son dos genes implicados en la formación de hueso nuevo durante el desarrollo embrionario. En las células sin diferenciar se detecta la presencia de ARN mensajero de ambos genes, sin embargo, la diferenciación aumenta la expresión de ambos genes. La osteonectina participa, conjuntamente con la laminina, en el proceso de formación de membranas basales en tejidos no óseos. En la decidua humana se han observado altos niveles de ARN mensajero para esta proteína, sugiriéndose que pueda estar implicada en los procesos de proliferación celular y síntesis de membrana basales *de novo* durante los cambios que sufre la decidua al comienzo del embarazo (Wewer y col., 1988). Por otro lado, la placenta humana, participa de forma activa en la regulación del metabolismo del calcio durante el embarazo. Los requerimientos del feto en

crecimiento producen cambios en la homeostasis del calcio materno, dando lugar al transporte activo de calcio a través de la placenta. Este transporte activo de calcio debe regularse para mantener un equilibrio exacto entre el esqueleto y los fluidos extracelulares en la madre. Esta regulación se ejerce principalmente por la vía hormonal (Ardawi y col., 1997). Una de las hormonas implicadas en esta regulación es osteocalcina, que aumenta considerablemente en el suero materno en el tercer trimestre de gestación (Kovacs y Kronenberg, 1997). Se han identificado en varios tejidos no óseos seis isoformas de osteocalcina resultantes de *splicing* alternativo, algunas de las cuales se expresan en la placenta en bajas cantidades (Jung y col., 2001).

El protocolo más utilizado en la bibliografía para la diferenciación condrogénica está basado en la generación de un cuerpo cartilaginoso a partir de un sedimento celular. La diferenciación en monocapa no suele realizarse habitualmente, aunque ha demostrado ser efectiva en células provenientes de distintos recursos, como el líquido amniótico (Kim y col., 2007), las membranas fetales (Soncini y col., 2007), la médula ósea (Chen y col., 2008) o la decidua basalis (Huang y col., 2009). Las células derivadas de la decidua humana caracterizadas en este trabajo muestran una elevada capacidad de diferenciación hacia el linaje condrogénico en monocapa. Esta diferenciación no sucede de forma espontánea sino que son necesarios los estímulos adecuados. Además de la detección mediante inmunocitoquímica de agregan y condroitin sulfato, dos proteínas características de la matriz extracelular del cartílago, mediante el análisis del ARN purificado se detecta la presencia de transcrito activo para el gen de colágeno tipo II y para el gen Sox-9. El colágeno tipo II es la isoforma de este complejo que se expresa de forma específica en el cartílago y Sox-9 es un gen que actúa durante el proceso de condensación del cartílago, dirigiendo la diferenciación de los condrocitos. La ausencia de ARN mensajero de estos genes en las células sin diferenciar, y su aparición después del procedimiento de diferenciación, junto con los cambios morfológicos y la creación de matriz extracelular de cartílago, demuestran la capacidad de diferenciación hacia el linaje condrogénico que presentan estas células.

Por otro lado, los resultados presentados demuestran la capacidad que tienen estas células derivadas de la decidua de diferenciarse *in vitro* a células de músculo esquelético, otro tejido que también deriva del mesodermo primitivo embrionario. Para la inducción, las células se sometieron previamente a un tratamiento con 5'-azacitidina

que posee la capacidad de bloquear de forma irreversible a la enzima metiltransferasa provocando la hipometilación del ADN (Balana y col., 2006), e induce una respuesta potenciada de los canales de calcio y potasio de la membrana celular, provocando cambios electrofisiológicos en la célula. De esta manera, genes que durante la organogénesis habían sido silenciados, vuelven a activarse (Balana y col., 2006 y Burlacu y col., 2008). El tratamiento con 5'-azacitidina ha demostrado ser eficaz en la diferenciación muscular y cardíaca en células madre mesenquimales de médula ósea debido a que promueve la expresión de factores específicos de músculo como  $\alpha$ -actinina, GATA-4 o desmina tanto a nivel génico como proteico (Balana y col., 2006; Burlacu, 2006 y Burlacu y col., 2008). Usando un medio de cultivo similar al empleado por nosotros en este estudio, se han obtenido células musculares a partir de células mesenquimales obtenidas de tejido adiposo (Zuk y col., 2002), de sangre de cordón umbilical (Gang y col., 2004), de células derivadas del endometrio (Meng y col., 2007) y del villi coriónico de la placenta (Wulf y col., 2004). Las células tipo mesenquimal descritas en este trabajo no sufren diferenciación de forma espontánea, lo que queda demostrado por la ausencia de expresión de dos proteínas específicas de músculo esquelético ( $\alpha$ -actinina y miosina) en las células indiferenciadas. Las células de la placenta aisladas por nosotros presentan una alta eficiencia de diferenciación a músculo esquelético, puesto que, prácticamente la totalidad de las células sometidas a diferenciación muestran la expresión de ambos marcadores. Las células sin diferenciar también expresan el gen de miogenina aunque la expresión es más de tres veces superior en las células diferenciadas. El gen de miogenina codifica para un factor de transcripción específico de músculo que está implicado en la inducción de la miogénesis en una amplia variedad de cultivos celulares y de tejidos (Hasty y col., 1993). Además, la expresión de este gen es esencial durante la organogénesis para el correcto desarrollo muscular (Hasty y col., 1993), así se ha observado que ratones que no expresan miogenina presentan un número normal de mioblastos pero mueren justo después del nacimiento al ser incapaces de formar miofibras (Nabeshima y col., 1993). En resumen, el gen de miogenina se expresa específicamente en los mioblastos, dirigiendo la formación de miofibras funcionales, a través del control de algunos de los genes involucrados en el proceso de diferenciación muscular (Davie y col., 2007). Se ha descrito también la presencia del ARN mensajero de miogenina en células derivadas del villi coriónico de la placenta humana y en células mesenquimales de la médula ósea (Fukuchi y col., 2004). En células mesenquimales de médula ósea también se ha

descrito la presencia de ARN mensajero de genes característicos de tejidos adultos diferenciados (Tondreau y col., 2004), sugiriéndose que la expresión en niveles basales de determinados genes específicos de tejidos diferenciados en las células sin diferenciar podría explicar el alto potencial de diferenciación *in vitro* de las células madre de tipo mesenquimal (Reyes y col., 2001 y Tondreau y col., 2004).

Además de la diferenciación a músculo esquelético, en este trabajo se muestra la diferenciación de las células de la placenta hacia músculo cardíaco. Varios estudios muestran la diferenciación de células embrionarias de ratón y humanas hacia cardiomiocitos (Boheler y col., 2002) y la obtención de cardiomiocitos contráctiles a partir de células derivadas del villi coriónico de la placenta humana mediante un sistema de cocultivo con cardiomiocitos de ratón (Okamoto y col., 2007). Aunque mediante nuestro protocolo de diferenciación no se obtienen células contráctiles, la diferenciación hacia el linaje cardíaco se pone de manifiesto por la detección de la proteína atrial natriurética (ANP), una hormona implicada en procesos cardiovasculares. Además, observamos la expresión tanto del gen de ANP como del homeobox *Nkx2.5*. Este homeobox contiene los genes encargados del desarrollo del corazón desde su etapa de tubo cardíaco embrionario hasta el corazón adulto (Shiojima y col., 1995). La diferenciación cardíaca presentada en este trabajo no sucede de forma espontánea, como se pone de manifiesto por la ausencia tanto del ARN mensajero como de las proteínas cardíacas en las células sin diferenciar. Mediante un medio de cultivo muy similar y tratamiento con 5'-azacitidina, se han diferenciado hacia el linaje cardíaco células provenientes de la médula ósea de adultos y células regenerativas obtenidas de la sangre menstrual, y al igual que nosotros, tampoco se obtuvieron células contráctiles (Xu y col., 2004; Meng y col., 2007 y Antonitsis y col., 2008). Sin embargo, otros autores no consiguieron estos resultados en las mismas condiciones de cultivo, pero con células madre mesenquimales de médula ósea de rata (Liu y col., 2003). Los resultados de Liu y col. podrían deberse por un lado, a una respuesta diferente en las células mesenquimales de rata o bien al uso de un medio de diferenciación inapropiado. El medio usado por Liu y col. no se complementó con FGF-básico como el utilizado por nosotros. Dado que parece ser que el FGF-básico potencia la expresión del fenotipo miogénico y promueve la formación de miotubos (Xu y col., 2004) su inclusión en el medio de diferenciación podría ser determinante puesto que podría existir una acción sinérgica entre 5'-azacitidina y FGF-básico en este proceso de diferenciación.



Además de las líneas mesodérmicas, las células tipo mesenquimal aquí presentadas, muestran la capacidad de diferenciarse a células de tipo endodérmico. En este sentido, hemos observado diferenciación hepato-pancreática y pulmonar. Se ha demostrado en células embrionarias humanas que el hígado y el páncreas comparten un precursor embrionario común (Deutsch y col., 2001). Este cuerpo hepato-pancreático embrionario se desarrolla a partir de un dominio del endodermo ventral y posee la capacidad bipotencial de generar tanto el linaje hepático como el linaje pancreático. La elección del linaje hepático está dirigida por el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) secretado por el mesodermo cardíaco en el momento de su formación durante el desarrollo embrionario (Deutsch y col., 2001 y Zhao y Duncan, 2005). Un trabajo reciente, muestra que al cultivar explantes de endodermo ventral en ausencia de FGF, estos expresan ARN mensajeros pancreáticos, pero cuando FGF es incluido en el medio en bajas concentraciones, las células comienzan a expresar ARN mensajeros de hígado (Serls y col., 2005). Además, no sólo la presencia de FGF es primordial para la formación del linaje hepático, sino que también es esencial su concentración local (Zhao y Duncan, 2005). En este trabajo se muestra la capacidad de diferenciación hepato-pancreática de las células que hemos obtenido de la decidua humana. Durante esta diferenciación se forma un cuerpo hepato-pancreático o hepatoesfera caracterizado por la expresión tanto de albúmina (producto celular hepático) como de insulina (producto característico de los islotes del páncreas). Pocos son los autores que han descrito la formación de este cuerpo hepato-pancreático a partir de células madre adultas pero hemos encontrado una elevada similitud entre nuestros resultados y los obtenidos con las células multipotenciales obtenidas de sangre de cordón umbilical (BioE, Inc. Methods for directed differentiation of MLPC) y las células regenerativas obtenidas del endometrio a través de la sangre menstrual (Meng y col., 2007). Debido a que el medio de diferenciación hepato-pancreática contiene insulina y albúmina, nos planteamos si la expresión de ambas proteínas observada por inmunofluorescencia podría deberse a la captación desde el medio de cultivo de estas proteínas por las células. Sin embargo, el análisis del ARN purificado muestra la presencia de transcritos activos para los genes de insulina y albúmina en las células sometidas al proceso de diferenciación y su ausencia en las células sin diferenciar. Este dato confirma la producción de estas proteínas por parte de las células diferenciadas al linaje hepato-pancreático y no a depósitos intracelulares generados a partir de la captación de estas moléculas del medio de diferenciación. Además, las hepatoesferas obtenidas tienen la capacidad de almacenar

glicógeno, función ausente en las células sin diferenciar lo que sugiere que las células diferenciadas que componen la hepatoesfera poseen características funcionales de hepatocitos. Se han obtenido células hepáticas a partir de células mesenquimales de médula ósea (Lee y col., 2004), células mesenquimales obtenidas del tejido adiposo (Taléns-Visconti y col., 2006), células mesenquimales derivadas del amnio (Tamagawa y col., 2007) y células multipotenciales derivadas del villi coriónico de la placenta humana (Chien y col., 2006).

Existen varias publicaciones donde se describe la capacidad de diferenciación de distintos tipos de células madre, bien hacia el linaje hepático, o bien hacia el linaje pancreático. Desde el punto de vista de la diferenciación pancreática, se han obtenido células positivas para insulina mediante inmunocitoquímica a partir de células derivadas del villi coriónico (Chang y col., 2007) y de sangre de cordón umbilical (Denner y col., 2007 y Sun y col., 2007). En estos tres estudios, se utilizó un medio de diferenciación complementado con insulina, sin embargo, en ninguno de los casos se muestra la expresión del gen de esta proteína vía análisis del ARN mensajero. Por el contrario, el estudio de Miki y col. sobre la diferenciación de las células epiteliales del amnio hacia el linaje pancreático muestra la expresión de transcrito activo para el gen de insulina después de la diferenciación, aunque no puede demostrar la presencia de la proteína en las células mediante inmunocitoquímica (Miki y col., 2005). En el presente trabajo, demostramos tanto la expresión de la proteína como de su gen, en las células obtenidas de la placenta después de la diferenciación.

La elección entre replicación y diferenciación determina el destino de las células madre adultas; siendo necesario un delicado balance entre ambos procesos para el mantenimiento de la homeostasis tisular o durante la respuesta frente a una lesión. Es decir, las señales que una célula madre recibe de su microambiente tisular o nicho, determinan el comportamiento final de esta célula frente a las diferentes situaciones fisiológicas o patológicas (Naveiras, 2006). El nicho será, por tanto, el encargado del destino tanto de las células madre que en él habitan, como de aquellas que lleguen a él de forma natural, a consecuencia de su transporte desde otros nichos, o de forma artificial, mediante procedimientos de terapia celular. La plasticidad de las células madre adultas es un concepto muy joven rodeado aún de una elevada controversia. En el ámbito de la diferenciación hepática, se han descrito casos en los que la diferenciación

hacia hepatocitos se debía a procesos de fusión celular. Estos hallazgos hacen que muchos investigadores pongan en duda la existencia de verdaderos fenómenos de diferenciación y, por tanto, se ponga en duda la verdadera plasticidad de las células madre. En los procesos de diferenciación hepática *in vitro*, la fusión espontánea sólo ocurre en los cocultivos con células hepáticas con una frecuencia muy baja, de una por cada  $10^3$ - $10^6$  células cocultivadas (Snykers y col., 2009). Como método para simular el nicho hepático y así estudiar el comportamiento de las células madre derivadas de la decidua humana, se ha elegido el procedimiento de cocultivo en *Transwell* frente a tejido hepático sano y lesionado. Con este sistema, se evita el contacto directo entre el tejido y las células, al quedar separados por una membrana con un pequeño diámetro de poro que permite, sin embargo, la libre circulación de factores químicos desde el tejido hacia las células localizadas en la cámara superior. De esta manera, el comportamiento observado en las células derivadas de la decidua humana no será fruto de ningún proceso de fusión celular, sino de una respuesta frente al microambiente inductor generado por el tejido.

El tejido hepático tanto sano como lesionado se obtuvo de ratones Balb/c sanos. Para la obtención del tejido hepático lesionado en nuestro laboratorio hemos elegido el modelo de fibrosis hepática basado en la lesión mediante el tratamiento con tetracloruro de carbono durante 48 horas ya que se trata de una técnica sencilla, fácilmente reproducible y que proporciona una duración limitada de la inducción. La cirrosis hepática es la principal causa de muerte en pacientes que presentan enfermedad hepática crónica, causando además serias complicaciones que finalmente resultan en un fallo hepático (Belghiti y col., 2000). La fibrosis hepática supone un punto clave en la progresión de la cirrosis, por lo que los modelos animales de fibrosis hepática, resultan esenciales en la investigación experimental destinada a la aplicación de recursos clínicos como la reperfusión de la lesión o administración de sustancias anticirróticas. Hasta la fecha, se han propuesto diversos modelos animales destinados al estudio de la fibrosis hepática, en los cuales la lesión hepática se produce bien mediante el tratamiento con agentes químicos hepatotóxicos (paracetamol y tetracloruro de carbono) o bien con procedimientos quirúrgicos como la hepatectomía parcial (Jang y col., 2008). Un modelo animal debe cumplir unos requisitos tales que sea fácil de realizar, que produzca un adecuado grado de fibrosis, una duración limitada de la inducción, elevada reproducibilidad y que requiera una mínima manipulación por el personal que lo realiza

(Jang y col., 2008). La lesión hepática inducida mediante el tratamiento con tetracloruro de carbono elegida en este estudio puede progresar hacia una necrosis catastrófica en el conjunto del hígado, lo que va a depender de la dosis administrada, la periodicidad de la administración y el tiempo de exposición a la droga, principalmente. Sin embargo, cuando la dosis del agente hepatotóxico es baja y el tiempo de exposición a la misma es limitado, el hígado es capaz de regenerarse y renovarse totalmente (Weber y col., 2003). Es precisamente, durante este proceso regenerativo durante el cual suceden las señales moleculares y fisiológicas que provocan los cambios de expresión en los marcadores hepáticos  $\alpha$ -fetoproteína y albúmina, entre otros. Los resultados presentados en este trabajo y resultantes del proceso de cocultivo de las células derivadas de la decidua tanto con tejido lesionado como con tejido sano, son coherentes con el comportamiento molecular *in vivo* de los marcadores hepáticos  $\alpha$ -fetoproteína y albúmina. En presencia de ambos tejidos se puede observar que las células derivadas de la placenta presentan un descenso en la expresión de ARN mensajero de  $\alpha$ -fetoproteína y un aumento en la expresión del ARN mensajero de albúmina durante el transcurso del cocultivo. Las células de la decidua en presencia de medio sin tejido hepático (sano o lesionado) presentan una expresión casi despreciable de ambos genes.

Durante la embriogénesis, la  $\alpha$ -fetoproteína se detecta en el endodermo visceral proveniente del saco vitelino. En este estadio es la proteína dominante en suero, aunque posteriormente se detecta principalmente en el hígado fetal. Al final del periodo embrionario, en el momento en que sucede la reestructuración del hígado, sucede un descenso acusado en los niveles de  $\alpha$ -fetoproteína, al reducirse el número de células productoras. Simultáneamente, los niveles de albúmina se incrementan pasando a ser la proteína mayoritaria del suero. Esta regulación sucede fundamentalmente a nivel transcripcional, es decir, la regulación de los niveles proteicos viene marcada por los niveles de ARN mensajero (Lazarevich, 2000). La expresión de  $\alpha$ -fetoproteína no se reprime de forma irreversible en el adulto, sino que en procesos de regeneración hepática inducidos después de un daño físico o químico se produce una reactivación de su expresión. De forma simultánea a la inducción de  $\alpha$ -fetoproteína, la síntesis de albúmina se ve disminuida durante los procesos de regeneración del hígado (Lazarevich, 2000). Por esta razón se considera que la  $\alpha$ -fetoproteína es un excelente indicador del proceso de regeneración que sigue a una lesión hepática y un indicador temprano de diferenciación hepática. El grado de diferenciación y madurez de las células obtenidas

al término de un proceso de diferenciación hepática *in vitro*, puede por tanto medirse, por un descenso en los niveles de  $\alpha$ -fetoproteína y un aumento en los niveles de albúmina (Schwartz y col., 2002). Los resultados obtenidos en los experimentos de cocultivo de las células de la placenta con hígado indican que en presencia de un microambiente hepático, las células reciben una señal de diferenciación y/o regeneración hepática que da paso a una progresiva maduración hacia hepatocitos de las células diferenciadas. En presencia de hígado sano las células aisladas en nuestro laboratorio tienen una expresión alta del gen de  $\alpha$ -fetoproteína que va disminuyendo con el tiempo lo que indicaría el inicio de la diferenciación y/o regeneración. De forma simultánea, sucede el aumento en la expresión del gen de albúmina lo que indica la maduración de las células hacia hepatocitos. Un aspecto importante a señalar es que tanto la respuesta a la señal inicial de diferenciación y/o regeneración como a la posterior señal de maduración, son significativamente superiores en las células expuestas a tejido lesionado. En resumen, el microambiente tisular hepático induce la diferenciación hepática de las células obtenidas en nuestro laboratorio y además, en caso de daño hepático se induce una respuesta mayor de reparación y maduración en dichas células. Resultados similares a los presentados, se han obtenido cuando células madre mesenquimales de médula ósea se cocultivaron con células hepáticas estrelladas, que son las células encargadas de la secreción de la matriz extracelular depositada en las cicatrices fibróticas que suceden como respuesta a un daño hepático (Krizhanovsky y col., 2008). Al igual que los resultados presentados en este trabajo, las células derivadas de la médula ósea reciben una fuerte señal regenerativa que se caracteriza por un elevado nivel de expresión de ARN mensajero de  $\alpha$ -fetoproteína al inicio del cocultivo y un descenso posterior a lo largo del proceso de cocultivo, a la vez que, los niveles de ARN mensajero de albúmina aumentan (Deng y col., 2008).

Dentro de los derivados endodérmicos las células tipo mesenquimal de la placenta humana se diferencian a células alveolares tipo II. Las células alveolares de tipo II son las responsables de la producción y secreción de las proteínas surfactantes y son esenciales para la reparación del epitelio pulmonar maduro en caso de lesión (Reddy y col., 2004). Estas células son capaces de proliferar y diferenciarse hacia células alveolares de tipo I, las cuales son los componentes epiteliales encargados del intercambio gaseoso en el pulmón. En relación a la diferenciación pulmonar, se han obtenido previamente células del epitelio respiratorio a partir de células madre

embrionarias humanas (Samadikuchaksaraei, 2006), de células madre multipotentes obtenidas de sangre de cordón umbilical (Berger y col., 2006) y de células regenerativas del endometrio (Meng y col., 2007). La diferenciación pulmonar presentada en este trabajo se pone de manifiesto por un lado, por el cambio morfológico de las células (de fibroblasto a células epiteliales) y, por otro, por la presencia en su interior de las ultraestructuras típicas de las células alveolares, llamadas cuerpos lamelares. Estos cuerpos lamelares son lisosomas de almacenaje y secreción que se han identificado en varios tipos celulares, pero en el caso de las células alveolares tipo II se encargan del almacenamiento y secreción de las proteínas surfactantes del pulmón (Schmitz y Müller, 1991). La diferenciación se confirma también por la expresión de las proteínas surfactantes B y C en las células diferenciadas y por la expresión de los genes para la proteína surfactante B y GATA-6. Las proteínas surfactantes B y C tienen funciones relacionadas con la reducción de la tensión superficial y el metabolismo del surfactante pulmonar. La deficiencia de proteína surfactante B produce grandes trastornos en la función respiratoria del recién nacido (De Mello y col., 1994). La función principal de la proteína surfactante B está fuertemente implicada en el empaquetamiento intracelular de las proteínas encargadas de mantener la tensión superficial en el epitelio respiratorio pues se encarga del procesamiento de la proteína prosurfactante C hasta su conformación final en surfactante C (Weaver y Conkright, 2001). La proteína prosurfactante C es una proteína integral de membrana que sólo se expresa en las células alveolares tipo II (Weaver y Conkright, 2001), por lo tanto, su expresión en las células diferenciadas a partir de las células de la placenta obtenidas en nuestro laboratorio sirve para confirmar la identidad de las células alveolares tipo II. El factor de transcripción GATA-6 se expresa en el epitelio distal del pulmón durante su desarrollo y actualmente es el único miembro de la familia GATA que se conoce que se expresa en el desarrollo pulmonar (Yang y col., 2002). GATA-6 está implicado en la regulación de la expresión génica durante el desarrollo del pulmón (Yang y col., 2002), activando genes característicos del epitelio pulmonar como el gen de la proteína surfactante A, el de la proteína surfactante C o el gen *Wnt7b*, imprescindibles para la diferenciación del epitelio pulmonar *in vivo* (Zhang y col., 2007). Utilizando células embrionarias murinas *GATA-6<sup>-/-</sup>* para la construcción de ratones quiméricos, se ha demostrado que la inhibición de la función de este gen resulta en una inhibición temprana de la diferenciación celular en el epitelio pulmonar a nivel de los pneumocitos tipo II (Keijzer y col., 2001 y Yang y col., 2002). Estos datos indican que GATA-6 es

uno de los principales factores que direccionan la diferenciación de las células alveolares tipo II hacia las células alveolares tipo I, las células maduras del pulmón. Podemos, por tanto concluir, que la presencia de transcrito activo de GATA-6 en las células diferenciadas hacia el linaje pulmonar a partir de las células derivadas de la decidua en nuestro laboratorio, refuerza la identidad como pneumocitos tipo II de las mismas. Teniendo en cuenta los datos encontrados en la bibliografía, esta es la primera vez que se obtienen células alveolares de tipo II a partir de células multipotenciales derivadas de la placenta humana.

Desde el punto de vista de los derivados ectodérmicos, hemos estudiado la capacidad de diferenciación hacia el linaje neural de las células derivadas de la decidua humana. El sistema nervioso presenta una limitada capacidad de regeneración después de sufrir una lesión, por lo tanto, el trasplante celular se considera actualmente como un método prometedor para la recuperación del sistema nervioso en condiciones de enfermedad o lesión. En este sentido, muchos grupos de investigación han estudiado la capacidad de diferenciación *in vitro* hacia el linaje neural de células madre procedentes del villi coriónico (Igura y col., 2004), la gelatina de Wharton del cordón umbilical (Mitchell y col., 2003), sangre periférica y médula ósea de rata (Kim y col., 2006), médula ósea humana (Miao y col., 2006), membrana amniótica (Miki y col., 2005 e Ilancheran y col., 2007), líquido amniótico (Kim y col., 2007), endometrio (Meng y col., 2007), tejido adiposo (Schäffler y Büchler, 2007) y membrana coriónica (Portmann-Lanz y col., 2006 y Portmann-Lanz y col., 2010). Los medios empleados en la diferenciación neural son variados e incluyen diferentes factores de crecimiento solos o combinados y, el empleo de diferentes agentes químicos como DMSO, AMPc, isobutilmetilxantina,  $\beta$ -mercaptoetanol, etcétera. No obstante, existe un trabajo de investigación que pone en duda la diferenciación de las células mesenquimales hacia células de tipo neuronal mediante el uso de agentes químicos como el DMSO y BHA (Lu y col., 2004). Estos autores proponen que el cambio morfológico observado en las células mesenquimales de médula ósea utilizadas podría ser debido a efectos tóxicos o artefactuales de los agentes químicos presentes en el medio y no a una verdadera diferenciación dado que las células obtenidas no expresan uno de los marcadores fundamentales de diferenciación neural, la  $\beta$  III tubulina (Lu y col., 2004). La diferenciación neural de las células derivadas de la decidua en nuestro laboratorio, se pone de manifiesto, en primer lugar por un cambio morfológico. Las células cambian la morfología de tipo fibroblasto

a una morfología típica de neuronas, consistente en un cuerpo celular del que emergen prolongaciones en sentido bipolar o multipolar. Sin embargo, en nuestro caso el cambio morfológico se asocia con la expresión de marcadores del linaje neural, como son  $\beta$  III tubulina y NF200. Algunos autores han descrito la diferenciación espontánea hacia el linaje neural de células provenientes de médula ósea adulta de rata (Tseng y col., 2007), de células madre adultas del tejido adiposo (Rubio y col., 2005) e incluso de células embrionarias (Reubinoff y col., 2001). Las células caracterizadas en nuestro laboratorio no sufren diferenciación espontánea, como queda demostrado por la ausencia de expresión de los marcadores del linaje neural  $\beta$  III tubulina y NF200 en las células sin diferenciar. Según los datos de los que disponemos hasta la fecha, esta es la primera vez que se consigue la diferenciación hacia el linaje neural a partir de células derivadas de la decidua humana.

Un resultado sorprendente es el obtenido con fibroblastos de piel humana pertenecientes a los primeros pases del cultivo. Estos fibroblastos presentaron un cierto grado de diferenciación neural bajo las mismas condiciones que las células de la placenta y que se evidencia por el cambio morfológico y la expresión de la proteína  $\beta$  III tubulina, aunque no se detectó la expresión de NF200. Los fibroblastos de piel humana suelen utilizarse como control negativo para evaluar la plasticidad de otros tipos celulares, al considerarse una población celular completamente diferenciada. No obstante, existen varios estudios que han demostrado la capacidad de diferenciación hacia el linaje mesodérmico típico de los fibroblastos adultos (Xu y col., 1993; Jeney y col., 2000; Rutherford y col., 2002; Yates y Glowacki, 2003 y Mizuno y Glowacki, 2005). Más recientemente, se ha descrito que los fibroblastos de piel obtenidos mediante la técnica del explante componen una población heterogénea que contiene células progenitoras con varios niveles de plasticidad hacia linajes celulares como el adipogénico, osteogénico condrogénico, hepático y neural, y que esta capacidad se pierde a medida que las células se van pasando durante el cultivo (Chen y col., 2007). Al igual que en el estudio de Chen y col., los fibroblastos de piel utilizados en el presente trabajo pierden su capacidad de diferenciación a lo largo del proceso de cultivo. Así, los fibroblastos correspondientes al pase ocho ya no experimentan cambio morfológico ni expresan  $\beta$  III tubulina después de la diferenciación. Esto podría indicar que los fibroblastos utilizados como control negativo en el presente trabajo presentaron un cierto grado de diferenciación hacia el linaje neural, debido a la presencia de precursores con un alto



grado de confinamiento hacia el linaje ectodérmico del que derivan tanto la piel como el sistema nervioso. Dichos precursores pierden la capacidad de diferenciación durante el cultivo o no sobreviven a los sucesivos pases.

En resumen, las células tipo mesenquimal obtenidas de la decidua de la placenta humana tienen la capacidad de diferenciarse *in vitro* hacia células derivadas de las tres capas germinales y esta capacidad se mantiene a lo largo de todo el cultivo. Aún son necesarios estudios más exhaustivos que ayuden a conocer mejor la biología de las células madre derivadas de las membranas extraembrionarias, pero los resultados aquí presentados sugieren que estas células son células madre multipotentes capaces de generar una amplia variedad de linajes celulares. Además, son susceptibles almacenarse mediante criopreservación y de manipularse genéticamente mediante una técnica no viral, lo que las convierte en posibles candidatas para la ingeniería de tejidos y la terapia celular en un futuro.



## VII. COROLARIO Y CONCLUSIÓN FINAL.



### **COROLARIO:**

1.- Mediante una técnica sencilla de digestión enzimática se obtiene una población heterogénea de células con la capacidad de adherencia al plástico a partir de las membranas extraembrionarias de la placenta humana. Dichas células son de origen materno, es decir, de la decidua, sugiriendo que tejidos adultos altamente especializados como es la decidua, son nicho de células madre.

2.- La población heterogénea al inicio va conformando una población homogénea de células con morfología de fibroblasto que presentan un fenotipo característico de células de tipo mesenquimal. Dicho fenotipo es estable durante todo el proceso de cultivo.

3.- Mediante técnicas estándar de cultivos primarios, las células derivadas de la decidua pueden expandirse en cultivo sin sufrir diferenciación espontánea y manteniendo estable su cariotipo. Sin embargo, presentan un número de divisiones finito debido a que expresan bajos niveles de actividad telomerasa que además desaparece con los sucesivos pases. Estos resultados sugieren que estas células no van a presentar un elevado poder tumorigénico *in vivo*. Además, estas células son susceptibles de criopreservación sin modificar su comportamiento en cultivo.

4.- Las células caracterizadas en este trabajo son capaces de diferenciarse *in vitro* hacia células de las tres capas germinales bajo los estímulos adecuados, sugiriendo que pueden ser una población candidata para su uso en medicina regenerativa en el futuro.

5.- Mediante la técnica de nucleofección se pueden introducir genes exógenos en dichas células con una alta eficiencia, lo que las convierte en un recurso muy atractivo para tratamientos de terapia génica.

### **CONCLUSIÓN FINAL:**

Las células de tipo mesenquimal presentadas en este trabajo se consideran células madre adultas que quedan exentas de cualquier implicación bioética. Por otro lado, la placenta se desecha después del alumbramiento, lo que es interesante dado que es un recurso para la obtención de diversas poblaciones de células madre sin ningún riesgo para el donante. Por lo tanto, la placenta puede ser una fuente de células madre importante con un posible uso futuro en estudios clínicos en humanos en medicina regenerativa.



## VIII. BIBLIOGRAFÍA.





Abbas AK y Lichtman AH. El complejo mayor de histocompatibilidad. Inmunología celular y molecular, quinta edición. Saunders Elsevier España; 2004. ISBN: 9788481747102.

Abdallah BM y Kassem M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. *Gene Therapy*. 2008; 15: 109-116.

Akle CA, Adinolfi M, Welsh KI, Leibowitz S y McColl I. Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after trasplantation into volunteers. *The Lancet*. 1981; 2: 1003-1005.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K y Walter P. Química celular y biosíntesis. Biología molecular de la célula, cuarta edición. Garland Science, miembro de the Taylor & Francis Group; 2004. ISBN: 9788428213516.

Aluigi M, Fogli M, Curti A, Isidori A, Gruppioni E, Chiodoni Ccolombo MP, Versura P, D'errico-Grigioni A, Ferri E, Baccarani M y Lemoli RM. Nucleofection Is an Efficient Nonviral Transfection Technique for Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*. 2006; 24: 454 461.

Alzogaray RA. Historia de las células: el camino hacia las unidades mínimas de la vida y su origen. Las perspectivas de crear vida en los laboratorios. Capital Intelectual. Argentina; 2006. ISBN: 9789871181827.

Antonitsis P, Ioannidou-Papagiannaki E, Kaidoglou A, Charokopos N, Kalogeridis A, Kouzi-Koliakou K, Kyriakopoulou I, Klonizakis I y Papakonstantinou C. Cardiomyogenic potential of human adult bone marrow mesenchymal stem cells *in vitro*. *The Thoracic and Cardiovascular Surgeon*. 2008; 56(2): 77-82.

Aplin JD. Implantation, trophoblast differentiation and haemochorial placentation: mechanistic evidence *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Cell Science*. 1991; 99: 681-692.

Ardawi MS, Nasrat HA y BA'Aqueel HS. Calcium-regulating hormones and parathyroid hormone-related peptide in normal human pregnancy and postpartum: a longitudinal study. *European Journal of Endocrinology*. 1997; 137: 402–409.

Ashton BA, Allen TD, Howlett CR, Eaglesom CC, Hattori A y Owen M. Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers *in vivo*. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 1980; 151: 294-307.

Bab I, Ashton BA, Gazit D, Marx G, Williamson MC y Owen ME. Kinetics and differentiation of marrow stromal cells in diffusion chambers *in vivo*. *Journal of Cell Science*. 1986; 84: 139-151.

Balana B, Nicoletti C, Zahanich I, Graf EM, Christ T, Boxberger S y Ravens U. 5-Azacytidine induces changes in electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells. *Cell Research*. 2006; 16(12): 949-960.

Barlow S, Brooke G, Chatterjee K, Price G, Pelekanos R, Rossetti T, Doody M, Venter D, Pain S, Gilshenan K y Atkinson K. Comparison of human placenta- and bone marrow-derived multipotent mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development*. 2008; 17(6): 1095-1107.

Belghiti J, Hiramatsu K, Benoist S, Massault P, Sauvanet A y Farges O. Seven hundred forty-seven hepatectomies in the 1990s: an update to evaluate the actual risk of liver resection. *Journal of the American College of Surgeons*. 2000;191(1): 38-46.

Ben-Shushan E, Thompson JR, Gudas LJ y Bergman Y. Rex-1, a gene encoding a transcription factor expressed in the early embryo, is regulated via Oct-3/4 and Oct-6 binding to an octamer site and a novel protein, Rox-1, binding to an adjacent site. *Molecular and Cellular Biology*. 1998; 18(4): 1866-1878.

Berger MJ, Adams SD, Tigges BM, Sprague SL, Wang X-J, Collins DP y McKenna DH. Differentiation of umbilical cord blood-derived multilineage progenitor cells into respiratory epithelial cells. *Cytotherapy*. 2006; 8: 480-487.

Bieback K, Kern S, Klüter H y Eichler H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells*. 2004; 22(4): 625-634.

BioE, Inc. Methods for directed differentiation of MLPC. [www.bioe.com](http://www.bioe.com)

Boheler KR, Czyz J, Tweedie D, Yang HT, Anisimov SV y Wobus AM. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circulation Research*. 2002; 91(3): 189-201.

Bonnet D. Hematopoietic Stem Cells. *Birth Defects Research*. 2003; 69: 219–229.

Bornstein R, Flores AI, Montalbán MA, del Rey MJ, de la Serna J y Gilsanz F. A modified cord blood collection method achieves sufficient cell levels for transplantation in most adult patients. *Stem Cells*. 2005; 23: 324-334.

Bossolasco P, Montemurro T, Cova L, Zangrossi S, Calzarossa C, Buiatitot S, Soligo D, Bosari S, Silani V, Lambertenghi Delilieri G, Rebulli P y Lazzari L. Molecular and phenotypic characterization of human amniotic fluid cells and their differentiation potential. *Cell Research*. 2006; 16: 329-336.

Brown JA y Boussiotis VA. Umbilical cord blood transplantation: basic biology and clinical challenges to immune reconstitution. *Clinical Immunology*. 2008; 127(3): 286-297.

Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, Cooper S, Bard J, English D, Arny M, Thomas L y Boyse EA. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1989; 86: 3828-3832.

Burlacu A. Can 5-azacytidine convert the adult stem cells into cardiomyocytes? A brief overview. *Archives of Physiology and Biochemistry*. 2006; 112(4-5): 260-264.

Burlacu A, Rosca AM, Maniu H, Titorencu I, Dragan E, Jinga V y Simionescu M. Promoting effect of 5-azacytidine on the myogenic differentiation of bone marrow stromal cells. *European Journal of Cell Biology*. 2008; 87(3): 173-184.

Campagnoli C, Bellantuono I, Kumar S, Fairbairn LJ, Roberts I y Fisk NM. High transduction efficiency of circulating first trimester fetal mesenchymal stem cells: potential targets for in utero ex vivo gene therapy. *BJOG: an international journal of obstetrics and gynecology*. 2002; 109: 952-954.

Cairo MS y Wagner JE. Placental and/or Umbilical Cord Blood: An Alternative Source of Hematopoietic Stem Cells for Transplantation. *Blood*: 1997; 90: 4665-4678.

Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, Kapoor N, Meyers P, Chiarieri D, McKenzie S, Broxmeyer HE y Moore MA. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood*; 1980; 56 (2): 289-301.

Chamberlain G, Fox J, Ashton B y Middleton J. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. *Stem Cells*. 2007;25: 2739 –2749.

Chang CM, Kao CL, Chang YL, Yang MJ, Chen YC, Sung BL, Tsai TH, Chao KC, Chiou SH y Ku HH. Placenta-derived multipotent stem cells induced to differentiate into insulin-positive cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007; 357: 414–420.

Chen Y, Shao JZ, Xiang LX, Dongb XJ y Zhang GR. Mesenchymal stem cells: A promising candidate in regenerative medicine. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2008; 40: 815-820.

Chen FG, Zhang WJ, Bi D, Liu W, Wei X, Chen FF, Zhu L, Cui L y Cao Y. Clonal analysis of nestin<sup>-</sup> vimentin<sup>+</sup> multipotent fibroblasts isolated from human dermis. *Journal of cell science*. 2007; 120 (16): 2875-2883.

Chien CC, Yen BL, Lee FK, Lai TH, Chen YC, Chan SH y Huang HI. *In Vitro* Differentiation of Human Placenta-Derived Multipotent Cells into Hepatocyte-Like Cells. *Stem Cells*. 2006; 24: 1759 –1768.

Cohen Y y Nagler A. Hematopoietic stem-cell transplantation using umbilical-cord blood. *Leukemia & Lymphoma*. 2003; 44(8): 1287-1299.

Colter DC, Class R, DiGirolamo CM y Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherence cells from human bone marrow. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2000; 97: 3213-3218.

Conconi MT, Burra P, Di Liddo R, Calore C, Turetta M, Bellini S, Bo P, Nussdorfer GG y Parnigotto PP. CD105(+) cells from Wharton's jelly show *in vitro* and *in vivo* myogenic differentiative potential. *International Journal of Molecular Medicine*. 2006; 18(6): 1089-1096.

Cunningham FG, Leveno KJ, Bloom SL, Hauth JC, Gilstrap LC III y Wenstrom KD. Implantation, Embryogenesis, and Placental Development. Williams Obstetrics, edición 22<sup>a</sup>. McGraw Hill. Estados Unidos; 2005. ISBN-10: 0071413154; ISBN-13: 9780071413152.

Czyz J, Wiese C, Rolletschek A, Blyszczuk P, Cross M y Wobus AM. Potential of Embryonic and Adult Stem Cells *in vitro*. *Biological Chemistry*. 2003; 384: 1391 – 1409.

Davie JK, Cho JH, Meadows E, Flynn JM, Knapp JR y Klein WH. Target gene selectivity of the myogenic basic helix-loop-helix transcription factor myogenin in embryonic muscle. *Developmental Biology*. 2007; 311(2): 650-664.

Deans RJ y Mosely AB. Mesenchymal stem cells; Biology and potential clinical uses. *Experimental Hematology*. 2000; 28: 875-884.

De Coppi P, Bartsch G Jr, Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, Mostoslavsky G, Serre AC, Snyder EY, Yoo JJ, Furth ME, Soker S y Atala A. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nature Biotechnology*. 2007; 25: 100-106.

De Mello DE, Noguee LM, Heyman S, Krous HF, Hussain M, Merritt TA Hsueh W, Haas JE, Heidelberger K, Schumacher R y Colten HR. Molecular and phenotypic variability in the congenital alveolar proteinosis syndrome associated with inherited surfactant protein B deficiency. *Journal of Pediatrics*. 1994; 125: 43-50.

Deng X, Chen YX, Zhang X, Zhang JP, Yin C, Yue HY, Lin Y, Han ZG y Xie WF. Hepatic stellate cells modulate the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells. *Journal of Cellular Physiology*. 2008; 217(1): 138-144.

Denner L, Bodenbun Y, Zhao JG, Howe M, Cappo J, Tilton RG, Copland JA, Forraz N, McGuckin C y Urban R. Directed engineering of umbilical cord blood stem cells to produce C-peptide and insulin. *Cell Proliferation*. 2007; 40(3): 367-380.

Deutsch G, Jung J, Zheng M, Lora J y Zaret KS. A bipotential precursor population for pancreas and liver within the embryonic endoderm. *Development*. 2001; 128 : 871-881.

Dieterlen MT, Wegner F, Schwarz SC, Milosevic J, Schneider B, Busch M, Römuß U, Brandt A, Storch A y Schwarz J. Non-viral gene transfer by nucleofection allows stable gene expression in human neural progenitor cells. *Journal of Neuroscience Methods*. 2009; 178(1): 15-23.

Dimitrov R, Kyurkchiev D, Timeva T, Yunakova M, Stamenova M, Shterev A y Kyurkchiev S. First-trimester human decidua contains a population of mesenchymal stem cells. *Fertility and Sterility*. 2010; 93(1): 210-219.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ y Horwitz EM. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 4: 315-317.

Dunn CL, Kelly RW y Critchley HO. Decidualization of the human endometrial stromal cell: an enigmatic transformation. *Reproductive Biomedicine Online*. 2003; 7(2): 151-161.

El-Badri NS, Maheshwari A y Sanberg PR. Mesenchymal stem cells in autoimmune disease. *Stem Cells and Development*. 2004; 13: 463-472.

Erices A, Conget P y Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *British Journal of Haematology*. 2000; 109(1): 235-242.

Fox H. A contemporary view of the human placenta. *Midwifery*. 1991; 7: 31-39.

Fu YS, Cheng YC, Lin MY, Cheng H, Chu PM, Chou SC, Shih YH, Ko MH y Sung MS. Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopaminergic neurons *in vitro*: potential therapeutic application for Parkinsonism. *Stem Cells*. 2006; 24(1); 115-124.

Fukuchi Y, Nakajima H, Sugiyama D, Hirose I, Kitamura T y Tsuji K. Human Placenta-Derived Cells Have Mesenchymal Stem/Progenitor Cell Potential. *Stem Cells*. 2004; 22: 649-658.

Friedenstein AJ, Gorskaja JF y Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental Hematology*. 1976; 4(5): 267-74.

Frassoni F, Labopin M, Bacigalupo A, Gluckman E, Rocha V, Bruno B, Lazarus H, Devine S, Holland K, McCarthy P, Curtin P, Maziarz R, Shpall E y Mosely AM. Expanded mesenchymal stem cells (MSC), coinfused with HLA identical hemopoietic stem cell transplants, reduce acute and chronic graft versus host disease: A matched paired analysis. *Bone Marrow Transplant*. 2002; 29(suppl 2):75.

Gang EJ, Jeong JA, Hong SH, Hwang SH, Kim SW, Yang IH, Ahn C, Han H y Kim H. Skeletal myogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from human umbilical cord blood. *Stem Cells*. 2004; 22:617-24.

Goodwin HS, Bicknese AR, Chien SN, Bogucki BD, Quinn CO y Wall DA. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2001; 7(11): 581-588.

Grosser O. Human and Comparative Placentation, Including the Early Stages Of Human Development. *The Lancet*. 1933; May (20): 1053-1058.

Gillio-Meina C, Hui YY y LaVoie HA. GATA-4 and GATA-6 transcription factors: expression, immunohistochemical localization, and possible function in the porcine ovary. *Biology of Reproduction*. 2003; 68(2): 412-422.

Guillot PV, Gotherstrom C, Chan J, Kurata H y Fisk NM. Human First-Trimester Fetal MSC Express Pluripotency Markers and Grow Faster and Have Longer Telomeres Than Adult MSC. *Stem Cells*. 2007; 25: 646–654.

Harvey JK. Uteroplacental Blood Flow. The Story of Decidualization, Menstruation, and Trophoblast Invasion. *American Journal of Pathology*. 2000; 157: 1759-1768.

Hasty P, Bradley A, Morris JH, Edmondson DG, Venuti JM, Olson EN y Klein WH. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature*. 1993; 364(6437):501-6.

Hayani A, Lampeter E, Viswanatha D, Morgan D y Salvi SN. First report of autologous cord blood transplantation in the treatment of a child with leukemia. *Pediatrics*. 2007; 119(1): e296-300.

Hohenstein KA, Pyle AD, Chern JY, Lock LF y Donovan PJ. Nucleofection mediates high-efficiency stable gene knockdown and transgene expression in human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2008; 26(6): 1436-1443.

Huang YC, Yang ZM, Chen XH, Tan MY, Wang J, Li XQ, Xie HQ y Deng L. Isolation of Mesenchymal Stem Cells from Human Placental Decidua Basalis and Resistance to Hypoxia and Serum Deprivation. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2009; 5(3): 247-255.



Igura K, Zhang X, Takahashi K, Mitsuru A, Yamaguchi S y Takahashi TA. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy*. 2004; 6: 543-553.

Ilancheran S, Michalska A, Peh G, Wallace EM, Pera M y Manuelpillai U. Stem cells derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potential. *Biology of Reproduction*. 2007; 77(3): 577-588.

Ilancheran S, Moodley Y y Manuelpillai U. Human Fetal Membranes: A Source of Stem Cells for Tissue Regeneration and Repair?. *Placenta*. 2009; 30: 2-10.

In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, de Groot-Swings GM, Claas FH, Fibbe WE y Kanhai HH. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells*. 2004; 22(7):1338-1345.

Jang YY, Collector MI, Baylin SB, Diehl AM y Sharkis SJ. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nature Cell Biology*. 2004; 6(6): 532-539.

Jang JH, Kang KJ, Kim YH, Kang YN y Lee IS. Reevaluation of experimental model of hepatic fibrosis induced by hepatotoxic drugs: an easy, applicable, and reproducible model. *Transplantation proceedings*. 2008; 40(8):2700-2703.

Jeney F, Bazsó-Dombi E, Oravecz K, Szabó J y Nagy IZ. Cytochemical studies on the fibroblast-preadipocyte relationships in cultured fibroblast cell lines. *Acta Histochemica*. 2000; 102(4): 381-389.

Jung C, Ou Y, Yeung F, Frierson HF Jr. y Koa C. Osteocalcin is incompletely spliced in non-osseous tissues. *Gene*. 2001; 271: 143-150.

Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, Kara F, Akay GG, Demiralp DO, Tukun A, Uckan D y Can A. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: *in situ* and *in vitro* surveys. *Stem Cells*. 2007; 25(2): 319-331.

Keijzer R, van Tuyl M, Meijers C, Post M, Tibboel D, Grosveld F y Koutsourakis M. The transcription factor GATA6 is essential for branching morphogenesis and epithelial cell differentiation during fetal pulmonary development. *Development*. 2001; 128(4): 503-511.

Kim S, Honmou O, Kato K, Nonaka T, Houkin K, Hamada H y Kocsis JD. Neural differentiation potential of peripheral blood- and bone-marrow-derived precursor cells. *Brain Research*. 2006; 1123(1): 27-33.

Kim J, Lee Y, Kim H, Hwang KJ, Kwon HC, Kim SK, Cho DJ, Kang SG y You J. Human amniotic fluid-derived stem cells have characteristics of multipotent stem cells. *Cell Proliferation*. 2007; 40: 75–90.

Klyushnenkova E, Mosca JD, Zernetkina V, Majumdar MK, Beggs KJ, Simonetti DW, Deans RJ y McIntosh KR. T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. *Journal of Biomedical Science*. 2005; 12:47-57.

Koller MR, Manchel I, Maher RJ, Goltry KL, Armstrong RD y Smith AK. Clinical-scale human umbilical cord blood cell expansion in a novel automated perfusion culture system. *Bone Marrow Transplantation*. 1998; 21: 653-663.

Kovacs CS y Kronenberg HM. Maternal-Fetal Calcium and Bone Metabolism During Pregnancy, Puerperium, and Lactation. *Endocrine Reviews*. 1997; 18(6): 832–872.

Krizhanovsky V, Yon M, Dickins RA, Hearn S, Simon J, Miething C, Yee H, Zender L y Lowe SW. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell*. 2008; 134(4): 657-667.

Laughlin MJ, Barker J, Bambach B, Koc ON, Rizzieri DA, Wagner JE, Gerson SL, Lazarus HM, Cairo M, Stevens CE, Rubinstein P y Kurtzberg J. Hematopoietic engraftment and survival in adult recipients of umbilical-cord blood from unrelated donors. *The New England Journal of Medicine*. 2001; 344(24): 1815-1822.

Lazarevich NL. Molecular mechanisms of alpha-fetoprotein gene expression. *Biochemistry (Moscow)*. 2000; 65(1):117-133.

Le Blanc K y Ringdén O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2005; 11(5): 321-334.

Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E y Ringdén O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Experimental Hematology*. 2003; 31(10): 890-896.

Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL y Chen TH. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*. 2004; 103(5): 1669-1675.

Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, Chen JR, Chen YP y Lee OK. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology*. 2004; 40: 1275-84.

Li H, Niederkorn JY, Neelam S, Mayhew E, Word RA, McCulley JP y Alizadeh H. Immunosuppressive factors secreted by human amniotic epithelial cells. *Investigative ophthalmology & Visual Science*. 2005; 46(3):900-907.

Li L y Xie T. Stem Cell Niche: Structure and Function. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2005; 21: 605–631.

Liu Y, Song J, Liu W, Wan Y, Chen X y Hu C. Growth and differentiation of rat bone marrow stromal cells: does 5-azacytidine trigger their cardiomyogenic differentiation?. *Cardiovascular Research*. 2003; 58(2): 460-468.

Lu P, Blesch A y Tuszynski MH. Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact?. *Journal of Neuroscience Research*. 2004; 77(2): 174-191.

Mann K, Fox SP, Abbs SJ, Yau SC, Scriven PN, Docherty Z y Ogilvie CM. Development and implementation of a new rapid aneuploidy diagnostic service within the UK National Health Service and implications for the future of prenatal diagnosis. *The Lancet*. 2001; 358: 1057-1061.

Marcus AJ, Coyne TM, Rauch J, Woodbury D y Black IB. Isolation, characterization, and differentiation of stem cells derived from the rat amniotic membrane. *Differentiation; research in biological diversity*. 2008; 76(2):130-144.

Marcus AJ y Woodbury D. Fetal stem cells from extra-embryonic tissues: do not discard. *Journal of Cell Molecular Medicine*. 2008; 12(3): 730-742.

Mareschi K, Biasin E, Piacibello W, Aglietta M, Madon E y Fagioli F. Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood. *Haematologica*. 2001; 86(10): 1099-1100.

Meng X, Ichim TE, Zhong J, Rogers A, Yin Z, Jackson J, Wang H, Ge W, Bogin V, Chan KW, Thébaud B y Riordan NH. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. *Journal of Translational Medicine*. 2007; 15: 57-67.

Miao Z, Jin J, Chen L, Zhu J, Huang W, Zhao J, Qian H y Zhang X. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: Comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Biology International*. 2006; 30: 681-687.

Miki T, Lehmann T, Cai H, Stolz DB y Strom SC. Stem Cell Characteristics of Amniotic Epithelial Cells. *Stem Cells*. 2005; 23: 1549-59.

Miltenyi Biotec. Methods book for nonhematopoietic (NH) stem cell media. [www.miltenyibiotec.com](http://www.miltenyibiotec.com)

Minguell JJ, Conget P y Erices A. Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2000; 33: 881-887.

Minguell JJ, Erices A y Conget P. Mesenchymal Stem Cells. *Experimental Biology and Medicine*. 2001; 226: 507-520.

Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, Martin P, Davis D, Morales L, Helwig B, Beerenstrauch M, Abou-Easa K, Hildreth T, Troyer D y Medicetty S. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells*. 2003; 21(1): 50-60.

Mizuno S y Glowacki J. Low oxygen tension enhances chondroinduction by demineralized bone matrix in human dermal fibroblasts in vitro. *Cells, Tissues, Organs*. 2005; 180(3): 151-158.

Moriscot C, de Fraipont F, Richard MJ, Marchand M, Savatier P, Bosco D, Favrot M y Benhamou PY. Human bone marrow mesenchymal stem cells can express insulin and key transcription factors of the endocrine pancreas developmental pathway upon genetic and/or microenvironmental manipulation in vitro. *Stem Cells*. 2005; 23(4): 594-603.

Mosca JD, Hendricks JK, Buyaner D, Davis-Sproul J, Chuang LC, Majumdar MK, Chopra R, Barry F, Murphy M, Thiede MA, Junker U, Rigg RJ, Forestell SP, Böhnlein E, Storb R y Sandmaier BM. Mesenchymal stem cells as vehicles for gene delivery. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2000; 379 (Supl): S71-S90.

Nabeshima Y, Hanaoka K, Hayasaka M, Esumi E, Li S, Nonaka I y Nabeshima Y. Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. *Nature*. 1993; 364(6437): 532-535.

National Institutes of Health, Department of Health and Human Services. Executive Summary. Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions. University Press of the Pacific. Estados Unidos. 2001. ISBN: 1410218961

Nauta AJ y Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells *Blood*. 2007; 110: 3499-3506.

Naveiras O y Daley GQ. Stem cells and their niche: a matter of fate. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2006; 63 (7-8): 760-766.

Nombela C. Células Madre: encrucijadas biológicas para la medicina: del tronco embrionario a la regeneración adulta. Editorial EDAF, S.A. España; 2007. ISBN: 9788441418233.

Niwa H. Molecular mechanism to maintain stem cell renewal of ES cells. *Cell Structure and Function*. 2001; 26(3):137-148.

Niwa H, Miyazaki J y Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature Genetics*. 2000; 24(4): 328-330.

Okamoto K, Miyoshi S, Toyoda M, Hida N, Ikegami Y, Makino H, Nishiyama N, Tsuji H, Cui CH, Segawa K, Uyama T, Kami D, Miyado K, Asada H, Matsumoto K, Saito H, Yoshimura Y, Ogawa S, Aeiba R, Yozu R y Umezawa A. 'Working' cardiomyocytes exhibiting plateau action potentials from human placenta-derived extraembryonic mesodermal cells. *Experimental Cell Research*. 2007; 313(12): 2550-2562.

Ooi J. The efficacy of unrelated cord blood transplantation for adult myelodysplastic syndrome. *Leukemia & Lymphoma*. 2006; 47(4): 599-602.

Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, Bilic G, Bühring HJ, Evangelista M, Hennerbichler S, Liu B, Magatti M, Mao N, Miki T, Marongiu F, Nakajima H, Nikaido T, Portmann-Lanz CB, Sankar V, Soncini M, Stadler G, Surbek D, Takahashi TA, Redl H, Sakuragawa N, Wolbank S, Zeisberger S, Zisch A y Strom SC. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells*. 2008; 26 (2): 300-311.

Pedrosa A. En Busca de la Inmortalidad: Una aproximación al debate actual sobre las Células Madre. Fundación José Manuel Lara. España; 2006. ISBN: 9788496556232.

Pera MF, Reubinoff B y Trounson A. Human embryonic stem cells. *Journal of Cell Science*. 2000; 113: 5-10.

Portmann-Lanz CB, Schoeberlein A, Huber A, Sager R, Malek A, Holzgreve W y Surbek DV. Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2006; 194: 664–73.

Portmann-Lanz CB, Schoeberlein A, Portmann R, Mohr S, Rollini P, Sager R y Surbek DV. Turning placenta into brain: placental mesenchymal stem cells differentiate into neurons and oligodendrocytes. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 2010; 202(3): 294.e1-294.e11.

Pountos I y Giannoudis PV. Biology of mesenchymal stem cells. *Injury, International Journal of the care of the Injured*. 2005; 36S: S8-S12.

Prockop DJ. Marrow Stromal Cells as Stem Cells for Nonhematopoietic Tissues. *Science*. 1997; 276: 71-74.

Reddy R, Buckley S, Doerken M, Barsky L, Weinberg K, Anderson KD, Warburton D y Driscoll B. Isolation of a putative progenitor subpopulation of alveolar epithelial type 2 cells. *American Journal of Physiology. Lung Cell Molecular Physiology*. 2004; 286(4): L658-667.

Reubinoff BE, Itsykson P, Turetsky T, Pera MF, Reinhartz E, Itzik A y Ben-Hur T. Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*. 2001; 19(12): 1134-1140.

Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L y Verfaillie CM. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*. 2001; 98(9): 2615-2625.

Roche S, Richard MJ y Favrot MC. Oct-4, Rex-1, and Gata-4 Expression in Human MSC Increase the Differentiation Efficiency But Not hTERT Expression. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2007; 101:271–280.

Romanov YA, Svintsitskaya VA y Smirnov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells*. 2003; 21(1): 105-110.

Rubio D, Garcia-Castro J, Martín MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd AC y Bernad A. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Research*. 2005; 65(8): 3035-3039.

Rutherford RB, Moalli M, Franceschi RT, Wang D, Gu K y Krebsbach PH. Bone morphogenetic protein-transduced human fibroblasts convert to osteoblasts and form bone *in vivo*. *Tissue Engineering*. 2002; 8(3): 441-452.

Ryan JM, Barry FP, Murphy JM y Mahon BP. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *Journal of Inflammation*. 2005; 2 (8).

Sadler TW. Third Month to Birth: The Fetus and Placenta. Langman's Medical Embryology. Ninth Edition. Lippincott, Williams And Wilkins. Estados Unidos; 2004. ISBN-10: 0781743109; ISBN-13: 978-0781743105.

Samadikuchaksaraei A, Cohen S, Isaac K, Rippon HJ, Polak JM, Bielby RC, y Bishop AE. Derivation of distal airway epithelium from human embryonic stem cells. *Tissue engineering*. 2006; 12: 867-875.

Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini MM y Davies JE. Human Umbilical Cord Perivascular (HUCPV) Cells: A Source of Mesenchymal Progenitors. *Stem Cells*. 2005; 23: 220–229.

Schäffler A y Büchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells*. 2007; 25(4): 818-827.

Schmitz G y Müller G. Structure and function of lamellar bodies, lipid-protein complexes involved in storage and secretion of cellular lipids. *Journal of Lipid Research*. 1991; 32(10): 1539-1570.



Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS y Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *The Journal of Clinical Investigation*. 2002; 109(10):1291-1302.

Secco M, Zucconi E, Vieira NM, Fogaça LL, Cerqueira A, Carvalho MD, Jazedje T, Okamoto OK, Muotri AR y Zatz M. Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood! *Stem Cells*. 2008; 26(1): 146-150.

Semenov OV, Koestenbauer S, Riegel M, Zech N, Zimmermann R, Zisch AH y Malek A. Multipotent mesenchymal stem cells from human placenta: critical parameters for isolation and maintenance of stemness after isolation. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*; 2009; 202(2): 193.e1-193.e13.

Serls AE, Doherty S, Parvatiyar P, Wells JM y Deutsch GH. Different thresholds of fibroblast growth factors pattern the ventral foregut into liver and lung. *Development*. 2005; 132: 35-47.

Shiojima I, Komuro I, Inazawa J, Nakahori Y, Matsushita I, Abe T, Nagai R y Yazaki Y. Assignment of cardiac homeobox gene CSX to human chromosome 5q34. *Genomics*. 1995; 27(1): 204-206.

Smith-Agreda V, Ferres Torres E y Montesinos Castro-Girona M. Anidación y placentación. Manual de embriología y anatomía general. Servei de Publicacions, Universitat de València, D.L. España; 1992: 85-95. ISBN: 9788437010069.

Snykers S, De Kock J, Rogiers V y Vanhaecke T. In vitro differentiation of embryonic and adult stem cells into hepatocytes: state of the art. *Stem Cells*. 2009; 27(3): 577-605.

Soler-Botija C, Cervera RP e Izpisua JC. The Biology of Tissue and Organ Regeneration. Cell Therapy. Mcgraw-Hill / Interamericana de España, S.A. España; 2008. ISBN: 8448167023; ISBN-13: 9788448167028.

Soncini M, Vertua E, Gibelli L, Zorzi F, Denegri M, Albertini A, Wengler GS y Parolini O. Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2007; 1: 296-305.

Strakova Z, Livak M, Krezalek M y Ihnatovych I. Multipotent properties of myofibroblast cells derived from human placenta. *Cell Tissue Research*. 2008; 332(3): 479-88.

Sun B, Roh KH, Lee SR, Lee YS y Kang KS. Induction of human umbilical cord blood-derived stem cells with embryonic stem cell phenotypes into insulin producing islet-like structure. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007; 354(4): 919-923.

Taléns-Visconti R, Bonora A, Jover R, Mirabet V, Carbonell F, Castell JV y Gómez-Lechón MJ. Hepatogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *World Journal of Gastroenterology*. 2006; 12(36): 5834-5845.

Tamagawa T, Oi S, Ishiwata I, Ishikawa H y Nakamura Y. Differentiation of mesenchymal cells derived from human amniotic membranes into hepatocyte-like cells in vitro. *Human cell: official journal of Human Cell Research Society*. 2007; 20(3): 77-84.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS y Jones JM. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science*. 1998; 282: 1145-1147.

Tondreau T, Lagneaux L, Dejeneffe M, Massy M, Mortier C, Delforge A y Bron D. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before any differentiation. *Differentiation*. 2004; 72: 319–326.

Troyer DL y Weiss ML. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells*. 2008; 26(3): 591-599.

Tseng PY, Chen CJ, Sheu CC, Yu CW y Huang YS. Spontaneous differentiation of adult rat marrow stromal cells in a long-term culture. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2007; 69(2): 95-102.

Tyndall A, Walker UA, Cope A, Dazzi F, De Bari C, Fibbe W, Guiducci S, Jones S, Jorgensen C, Le Blanc K, Luyten F, McGonagle D, Martin I, Bocelli-Tyndall C, Pennesi G, Pistoia V, Pitzalis C, Uccelli A, Wulffraat N y Feldmann M. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells: a review based on an interdisciplinary meeting held at the Kennedy Institute of Rheumatology Division, London, UK, 31 October 2005. *Arthritis Research & Therapy*. 2007; 9:301.

Varki A, Cummings R, Esko J, Freeze H, Hart G y Marth J. Glycosylation Changes in Ontogeny and Cell Activation. *Essentials of Glycobiology*, Primera edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2004. ISBN: 0879697709.

Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ, Fu YS, Lai MC y Chen CC. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells*. 2004; 22(7): 1330-1337.

Weaver TE y Conkright JJ. Function of surfactant proteins B and C. *Annual Review of Physiology*. 2001; 63: 555-578.

Weber LW, Boll M y Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Critical Reviews in Toxicology*. 2003; 33(2): 105-136.

Weiss ML, Medicetty S, Bledsoe AR, Rachakatla RS, Choi M, Merchav S, Luo Y, Rao MS, Velagaleti G y Troyer D. Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease. *Stem Cells*. 2006; 24(3): 781-792.

Wewer UM, Albrechtsen R, Fisher LW, Young MF y Termine D. Osteonectin /SPARC /BM-40 in Human Decidua and Carcinoma, Tissues Characterized by *De Novo* Formation of Basement Membrane. *American Journal of Pathology*. 1988; 132: 345-355.

Wexler SA, Donaldson C, Denning-Kendall P, Rice C, Bradley B y Hows JM. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *British Journal of Haematology*. 2003; 121(2): 368-374.

Wulf GG, Vierek V, Hemmerlein B, Haase D, Vehmeyer K, Pukrop T, Glass B, Emons G y Trümper L. Mesengenic Progenitor Cells Derived from Human Placenta. *Tissue Engineering*. 2004; 10: 1136-1147.

Xu RH, Rao HM, Zhu YP y Chai BF. Effects of osteogenesis on dermal fibroblasts cultured in vitro. *Chinese Medical Journal (Engl)*. 1993; 106(11): 825-829.

Xu W, Zhang X, Qian H, Zhu W, Sun X, Hu J, Zhou H y Chen Y. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro. *Experimental Biology and Medicine*. 2004; 229(7): 623-631.

Yang H, Lu MM, Zhang L, Whitsett JA y Morrissey EE. GATA6 regulates differentiation of distal lung epithelium. *Development*. 2002; 129(9): 2233-2246.

Yates KE y Glowacki J. Altered expression of connective tissue genes in postnatal chondroinduced human dermal fibroblasts. *Connective Tissue Research*. 2003; 44(3-4): 121-7.

Yen BL, Chien CC, Chen YC, Chen JT, Huang JS, Lee FK y Huang HI. Placenta-derived multipotent cells differentiate into neuronal and glial cells in vitro. *Tissue Engineering*. 2008; 14(1): 9-17.

Yen BL, Huang HI, Chien CC, Jui HY, Ko BS, Yao M, Shun CT, Yen M, Lee MC y Chena YC. Isolation of Multipotent Cells from Human Term Placenta. *Stem Cells*. 2005; 23: 3-9.

Yoshida-Koide U, Matsuda T, Saikawa K, Nakanuma Y, Yokota T, Asashima M y Koide H. Involvement of Ras in extraembryonic endoderm differentiation of embryonic stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004; 313(3): 475-481.

Zeitelhofer M, Vessey JP, Xie Y, Tübing F, Thomas S, Kiebler M y Dahm R. High-efficiency transfection of mammalian neurons via nucleofection. *Nature Protocols*. 2007; 2(7): 1692- 1704.

Zhang Y, Li C, Jiang X, Zhang S, Wu Y, Liu B, Tang P y Mao N. Human placenta-derived mesenchymal progenitor cells support culture expansion of long-term culture-initiating cells from cord blood CD34+ cells. *Experimental Hematology*. 2004; 32: 657–664.

Zhang Y, Rath N, Hannenhalli S, Wang Z, Cappola T, Kimura S, Atochina-Vasserman E, Lu MM, Beers MF y Morrissey EE. GATA and Nkx factors synergistically regulate tissue-specific gene expression and development *in vivo*. *Development*. 2007; 134(1): 189-198.

Zhao R y Duncan SA. Embryonic development of the liver. *Hepatology*. 2005; 41(5): 956-967.

Zhao RC, Liao L y Han Q. Mechanisms of and perspectives on the mesenchymal stem cell in immunotherapy. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 2004; 143: 284-291.

Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, Lagutina I, Grosveld GC, Osawa M, Nakauchi H y Sorrentino BP. The ABC transporter Bcrp1/ABCG<sub>2</sub> is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nature Medicine*. 2001; 7: 1028-1034.

Zipori D. The Stem State: Plasticity Is Essential, Whereas Self-Renewal and Hierarchy Are Optional. *Stem Cells*. 2005; 23: 719–726.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P y Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell*. 2002; 13: 4279-4295.

Zurriarain, RG (Coordinador). Células madre y Neurogénesis adulta en el cerebro humano. Celulas Madre: Ciencia, Etica y Derecho, primera edición. Ediciones Internacionales Universitarias, S.A; 2009. ISBN: 9788484692522.



